CAMILA FAZZANI

**Apoptose de linfócitos na
imunossupressão da leishmaniose
visceral em hamsteres infectados com
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Drº José Angelo Lauletta
Lindoso

São Paulo
2010

CAMILA FAZZANI

**Apoptose de linfócitos na
imunossupressão da leishmaniose
visceral em hamsteres infectados com
*Leishmania (Leishmania) chagasi***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientador: Drº José Angelo Lauletta
Lindoso

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Fazzani, Camila

Apoptose de linfócitos na imunossupressão da leishmaniose visceral em hamsteres infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi* / Camila Fazzani. -- São Paulo, 2010.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Fisiopatologia Experimental.

Orientador: José Angelo Lauletta Lindoso.

Descritores: 1.Imunossupressão 2.Leishmaniose visceral 3.Mesocricetus

USP/FM/DBD-438/10

À minha mãe e ao meu pai,

Obrigada por serem os meus melhores amigos. Obrigada pela educação, conselhos e apoio, essenciais para o meu crescimento e para o início difícil na carreira acadêmica, a “profissão utópica”.

Ao meu filho,

*Obrigada pelo sorriso ingênuo que
me incentiva sempre.*

Agradecimentos

Ao Professor Angelo, Dr. José Angelo Lauletta Lindoso do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP. Muito obrigada por confiar em mim para ser sua primeira aluna. Seus ensinamentos, compreensão e amizade foram essenciais em meu amadurecimento profissional e pessoal. Obrigada por ser mais que professor de graduação e orientador de mestrado, mas também meu pai científico.

A Dr. Edna Barbosa de Souza do laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, por segurar minhas mãos em cada passo meu. Obrigada pelos conselhos e ajudas indispensáveis na realização deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Hiro Goto, do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, por permitir o meu aprendizado e o desenvolvimento do trabalho em seu laboratório. Obrigada pelo auxílio e apoio, muitas vezes nos bastidores.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da USP, por permitir a realização em seu laboratório, de alguns experimentos apresentados neste trabalho.

Aos Dr. Roberto Zatz, Luzia e Wagner, do Laboratório de Fisiologia Renal da Faculdade de Medicina da USP por auxiliar na obtenção e até mesmo ceder reagente essencial no desenvolvimento deste trabalho.

As alunas de iniciação científica Priscilla de Assis Guedes e Anne Sena pelo comprometimento, estudo e ajuda nos experimentos, sem os quais não seriam possíveis alguns resultados apresentados neste trabalho.

Ao Alexandre Kiosh Taneno pelos estudos preliminares em sua iniciação científica que auxiliou o desenvolvimento de meu trabalho.

A Dr^a. Sandra Regina funcionária do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP, pela amizade, apoio e auxílio no desenvolvimento deste estudo.

Aos amigos Arnaldo Rodrigues e Viviane Reis pelo auxílio nos experimentos, convivência, incentivo e alegrias ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Medicina Tropical da USP: Renato Racickas, Nice Bonfim Pinto, Arthur de Jesus, Nilzete Mira da Silva e, em memória, Paulo de Oliveira, pela atenção dispensada no preparo de materiais e soluções, manutenção dos animais e convívio.

Aos colegas do Instituto de Medicina Tropical da USP: Beatriz Julieta Celeste, Célia Vendrame, Edite Kanashiro, Fábio Freitas, Fabrício Petito, Mussya Cisotto Rocha, Elizabette Ourique de Mello, Eduardo Sanchez, Luíza Reis e Taccyanna Mikulski Ali. Obrigada pelo auxílio nos experimentos e alegrias.

A Prof^a. Dr^a. Irene L. Noronha, do Laboratório de Nefrologia Celular, Genética e Molecular da Faculdade de Medicina da USP, e seus alunos e ex-alunos Becker, Camille, Andréia, Rita, Dimitri, Tatiana e Cleonice por serem essenciais em minha iniciação científica. Com vocês aprendi a ter comprometimento e responsabilidade no desenvolvimento de um projeto de pesquisa. Obrigada pelo aprendizado e pela amizade.

Ao meu pai, pelos conselhos, compreensão, paciência e investimento em minha vida profissional.

A minha mãe, pela preocupação nos dias em que cheguei tarde do laboratório. Muito obrigada pela compreensão e ajuda nos cuidados com João Pedro que possibilitaram a finalização desta dissertação.

A minha irmã, pela ajuda em análise estatística e gráficos de alguns resultados apresentados neste trabalho. Pela alegria sempre presente ao seu redor.

Ao Instituto de Medicina Tropical da USP por oferecer instalações e condições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao programa de fisiopatologia experimental pelo acolhimento. Obrigada Tânia e Líduvina por toda atenção.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de mestrado concedida no período de execução do projeto.

A todos que ao longo do desenvolvimento deste trabalho e de minha vida acadêmica, estiveram comigo me ajudando a entender, aprender, criticar, procurar, descobrir e conhecer.

*"Toda a nossa ciência, comparada
com a realidade, é primitiva e
infantil - e, no entanto, é a coisa
mais preciosa que temos"*

Albert Einstein

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Leishmaniose visceral e imunossupressão	01
1.2 Perfil de citocinas	04
1.3 Óxido nítrico	06
1.4 Apoptose de linfócitos	08
2 OBJETIVOS	11
3 MÉTODOS	13
3.1 Animais e parasitos	13
3.1.1 Animais	13
3.1.2 Parasitos	13
3.1.3 Purificação de amastigotas	13
3.2 Desenho de estudo	14
3.3 Detecção da carga parasitária em baço – segundo Stauber	15
3.4 Suspensão de células esplênicas	16
3.5 Proliferação de células esplênicas	16
3.6 Determinação de perfil de citocinas produzidos pelas células esplênicas.....	17
3.6.1 Extração, purificação e quantificação de RNA total.....	17
3.6.2 Obtenção de cDNA de RNA total por transcrição reversa	18

3.6.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR	19
3.7 Dosagem de nitrito em sobrenadante de células esplênicas estimuladas.....	20
3.8 Detecção de apoptose em células esplênicas não-aderentes	21
3.8.1 Detecção de fragmentação de DNA- Método TUNEL	21
3.8.2 Detecção de exposição de fosfatidilserina – Método de anexina V	22
3.8.3 Detecção da caspase 3 clivada – ASP 175	22
3.9 Análise estatística	23
3.10 Aspectos éticos	23
4 RESULTADOS	25
4.1 Evolução da carga parasitária em baço	25
4.2 Proliferação de células esplênicas	26
4.2.1 Padronização da concentração de concanavalina A e a antígeno de <i>Leishmania</i>	26
4.2.2 Avaliação da resposta proliferativa frente a mitógeno e antígeno específico	30
4.3 Perfil de citocinas produzido pelas células esplênicas	32
4.4 Produção de óxido nítrico por células esplênicas estimuladas	35
4.5 Avaliação da apoptose em células esplênicas não aderentes	38
4.5.1 Em células esplênicas não aderentes ex-vivo	39
4.5.2 Em células esplênicas estimuladas	44
4.5.3 Correlação dos resultados de apoptose	52
5 DISCUSSÃO.....	85
6 CONCLUSÕES	69
7 REFERÊNCIAS	72

Apêndice

Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do
HCFMUSP e da FMUSP – CAPPesq

Lista de Abreviaturas e Siglas

Ag	antígeno
ANEX	anexina V
BSA	albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
ConA	concanavalina A
cpm	cintilação por minuto
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
FITC	isoticianato de fluoresceína
HPRT	hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)
IFN- γ	interferon gama
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-10	interleucina 10
IL-12	interleucina 12
iNOS	sintase induzível do NO
LV	leishmaniose visceral
LLC	<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>
MHC	molécula de histocompatibilidade
NO	óxido nítrico (nitric oxide)
PBS	salina tamponada com fosfato
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI	iodeto de propídio (propidium iodide)
RNA	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)

RPMI	meio de cultura Instituto Roswell Park Memorial
RT-PCR	transcriptase reversa - PCR
SFB	soro fetal bovino
SH	soro de hamster
TAE	tampão
TdT	terminal deoxinucleotidil transferase
TGF- β	fator de crescimento e transformação beta (transforming growth factor)
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling

Lista de Símbolos

d	dias
h	horas
Kg	kilogramas
M	molar
mg	miligramas
mM	milimolar
mL	mililitros
ng	nanogramas
nm	nanometros
UI	unidades internacionais
°C	graus Celcius
μCi	microcurrie
μg	microgramas
μL	microlitros
μM	micromolar

Lista de Figuras

Figura 1	Desenho de estudo.....	15
Figura 2	Carga parasitária	25
Figura 3	Padronização de soro e mitógeno	27
Figura 4	Padronização da concentração de antígeno de <i>Leishmania</i>	29
Figura 5	Proliferação de células esplênicas de hamsteres	31
Figura 6	Pureza das amostras de RNA total	33
Figura 7	Bandas de citocinas de células esplênicas ex-vivo	34
Figura 8	Banda de citocinas de células esplênicas estimuladas	34
Figura 9	Curva padrão de produção de nitrito	35
Figura 10	Produção de nitrito em sobrenadante celular	37
Figura 11	Populações celulares	39
Figura 12	Deteção de apoptose em células esplênicas ex-vivo	40
Figura 13	Deteção de apoptose pelo método da anexina V em células esplênicas não aderentes ex-vivo	42
Figura 14	deteção de caspase 3 clivada em células ex-vivo	43
Figura 15	deteção de apoptose em células esplênicas estimuladas pelo método TUNEL	45
Figura 16	Deteção de morte em células esplênicas estimuladas	47
Figura 17	Fase inicial e tardia de apoptose em células estimuladas.....	50
Figura 18	Deteção de caspase 3 clivada por citometria de fluxo em células esplênicas estimuladas	52
Figura 19	Apoptose de células esplênicas ex-vivo	53
Figura 20	Apoptose de células esplênicas estimuladas	55

Lista de Tabelas

Tabela 1	Primers RT-PCR	20
Tabela 2	porcentagem de detecção de apoptose em células esplênicas não aderentes ex vivo, de hamsteres infectados e controle positivo, pelo método TUNEL.....	40
Tabela 3	Detecção de morte em células esplênicas ex-vivo	42
Tabela 4	Detecção de morte em células esplênicas não aderentes estimuladas com concanavalina A e antígeno de <i>Leishmania</i> em animais infectados e controle	48

Resumo

Hamsteres infectados com *Leishmania (L.) chagasi* são considerados um dos melhores modelos para estudo de fatores relacionados à imunossupressão que ocorre durante a leishmaniose visceral ativa, pois apresenta manifestações clínicas similares ao que ocorre no homem e não conseguem controlar a infecção. Neste estudo, hamsteres infectados intraperitonealmente com 2×10^7 parasitos foram utilizados para avaliação de possíveis fatores envolvidos na dinâmica da imunossupressão. Os parâmetros avaliados foram a produção de citocinas de padrão Th1 e Th2, produção de óxido nítrico por células esplênicas e detecção de apoptose em linfócitos esplênicos em tempos precoces (6, 20, 48 e 72 horas), intermediários (7 e 15 dias) e tardios (30 e 60 dias) de infecção. Inicialmente avaliamos a carga parasitária no baço e observamos aumento progressivo dependente do tempo de infecção, ratificando que hamster infectado é um bom modelo para desenvolvimento de doença. A resposta celular frente a mitógeno e antígeno de *Leishmania* foi o parâmetro utilizado para avaliação de imunossupressão. Observamos resposta preservada à concanavalina A em todos os tempos de infecção e resposta preservada ao antígeno de *Leishmania* nos tempos precoces, porém com ausência de resposta antígeno específica a partir do tempo de 7 dias de infecção. A quantificação de óxido nítrico foi determinada em sobrenadante de células esplênicas de cultura estimuladas com concanavalina A e antígeno de *Leishmania*, pelo método de Griess. Observamos inicialmente baixo nível de produção de óxido nítrico em todos os tempos de infecção, no entanto quando as células foram estimuladas com antígeno de *Leishmania* observamos níveis ainda menores nos tempos de 48 e 72 horas de infecção. O perfil de citocinas produzido foi determinado pela reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa, sendo detectado RNA mensageiro tanto de citocinas Th1, quanto Th2 em todos os tempos de infecção (precoce, intermediária e tardia), em células ex-vivo e estimuladas; e também em animais controles não infectados; não havendo um padrão de dicotomização de produção de citocinas neste modelo experimental. Detecção de apoptose em células esplênicas não aderentes (prováveis linfócitos T) ex-vivo e em cultura estimuladas com concanavalina A e antígeno de *Leishmania* foi avaliada pelos seguintes métodos: Anexina V, caspase 3 clivada e TUNEL por citometria de fluxo. Houve marcação da exposição de fosfatidil serina pelo método da anexina V, nos tempos de 6 horas de infecção, quando as células foram estimuladas com mitógeno ou antígeno de *Leishmania*; e com 48 horas e 60 dias de infecção somente quando estimuladas com antígeno de *Leishmania*. Em células esplênicas em cultura estimuladas com concanavalina não houve marcação de caspase 3 clivada, porém em células esplênicas ex-vivo nos tempos 20, 48 e 72 horas de infecção houve detecção de apoptose, definida por marcação de caspase 3 clivada. A marcação de células esplênicas não aderentes para quebra de DNA foi baixa em todos os tempos analisados, porém observamos aumento de marcação em células esplênicas não aderentes, estimuladas com antígeno nos tempos de 20 horas e posteriormente de 7 dias até 60 dias de infecção. Nossos resultados sugerem que a imunossupressão na leishmaniose visceral no modelo de hamsteres infectados com *Leishmania (L.) chagasi* é antígeno dependente e instala-se nos tempos intermediários de infecção, a partir de 7 dias. Esta imunossupressão parece estar relacionada com aumento de apoptose em linfócitos já nos tempos precoces de infecção, que pode favorecer a progressão da infecção, por ocorrer principalmente em células esplênicas antígenos reativas. Nossos dados sugerem ainda, que a imunossupressão não é decorrente da dicotomização da produção de citocinas Th1 e Th2.

Descritores: 1.Imunossupressão 2.Leishmaniose visceral 3.Mesocricetus

Summary

Hamsters infected by *Leishmania (L.) chagasi* are considered one of the most remarkable models to study several characteristics related to immunosuppression, raised during active visceral leishmaniasis especially because hamsters show similar clinical manifestations as it is found in humans without surmounting the infection. In this study, hamsters infected intraperitoneally with 2×10^7 parasites were used to evaluate the possible factors involved in the dynamic of immunosuppression that occurs during the disease development. The evaluated parameters were the production of Th1 and Th2 cytokines profile, nitric oxide production of splenic cells and detection of apoptosis in splenic lymphocytes at early (6, 20, 48 e 72 hours), intermediate (7 e 15 days) and late times (30 e 60 days) of infection. Initially, we evaluate the parasite load in the spleen and observed a progressive increase dependent on the time of infection, ratifying that infected hamsters are good models to set up the disease development. Cellular response upon mitogen or *Leishmania* antigen was the parameter used to evaluate the immunosuppression showing a preserved response to concanavalin A at all period of infection and a preserved response to the *Leishmania* antigen at all early phases however with no specific antigen response from 7 day of infection until the late phase of infection. Nitric oxide quantification was determined in the splenic cells supernatant in culture stimulated upon concanavalin A and *Leishmania* antigen and we observed initially low level of nitric oxide production, measured by the Griess method. Nonetheless, when the cells were stimulated upon *Leishmania* antigen we observed a lower level nitric oxide production at 48 and 72 hours of infection. mRNA of Th1 e Th2 cytokines profile was determined by RT-PCR at all period of infection studied in infected or non infected hamsters showing no difference at the cytokine profile in this experimental model. Detection of apoptosis in the non adherent splenic cells (probably T lymphocytes) ex-vivo and in the stimulated culture with concanavalin A and *Leishmania* antigen was evaluated by the following methods: annexin V-FITC, cleaved caspase 3 and TUNEL by flow cytometry analysis. There was phosphatidilserine staining by annexin method, at 6 hour of infection when cells were stimulated by mitogen or *Leishmania* antigen at 48 hours and 60 days of infection only when stimulated by *Leishmania* antigen. Splenic cells in culture stimulated by concanavalin A showed no cleaved caspase 3 staining in all period of infection studied. Otherwise, apoptosis was detected in the ex-vivo splenic cells at 20, 48 and 72 hours of infection by cleaved caspase 3 staining. We observed a low DNA break staining of non adherent splenic cells in all period analyzed, although this staining was increased in non adherent cells stimulated upon *Leishmania* antigen at 20 hours from 7 day of infection until 60 day of infection. Our results suggest that a visceral leishmaniasis immunosuppression in the hamsters model infected by *Leishmania (L.) chagasi* is antigen dependent and sets up in the intermediate phases of infection from 7 days on. This immunosuppression seems to be related to the apoptosis increase in lymphocytes already in the early period of infection probably favoring its progression especially because of its occurrence in reactive splenic antigen. Our data also suggest that the immunosuppression is not provided by dichotomization in the Th1 and Th2 cytokines profile.

Descriptors: 1.Immunosuppression 2.Leishmaniasis, visceral 3.Mesocricetus

INTRODUÇÃO

1 Introdução

1.1 Leishmaniose visceral e imunossupressão

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários e ocorrem em 88 países, sendo prevalente nas regiões tropicais e subtropicais (Clem¹). A WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)² estima que 2 milhões de novos casos ocorram anualmente sendo 500 mil casos de leishmaniose visceral (LV). No Brasil, em 2009, foram registrados 3600 casos de LV, cuja maioria ocorreu na região nordeste (MS³). No estado de São Paulo foram registrados 184 casos sendo 15 óbitos pela doença (CVE⁴). No Brasil, a LV é causada pelo protozoário *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (LLC) (Lainson e Shaw apud Peters e Killick-Kendrick⁵, Lainson e Shaw⁶, Bernan⁷ e Cupolillo et al.⁸) e transmitida, principalmente por flebotomíneos da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Warburg et al.⁹). A infecção ocorre quando flebotomíneos fêmeas, ao fazerem o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, inoculam formas promastigotas metacíclicas, que são fagocitadas pelas principais células hospedeiras, os macrófagos. No interior dos macrófagos, dependendo da resposta imune do hospedeiro, os parasitos se transformam em formas amastigotas e se proliferam, após replicação intensa arrebentam o macrófago infectado podendo infectar outros macrófagos, perpetuando assim o seu ciclo (Cunningham¹⁰, Mosser e Rosenthal¹¹ e Sacks et al. Apud Warren¹²). Em decorrência da resposta imune do hospedeiro pode haver diferentes formas clínicas, a saber: assintomática, oligossintomática e clássica. A primeira é caracterizada por sorologia positiva para leishmaniose sem manifestação clínica da doença (Sacks et al. Apud Warren¹²). A

forma oligossintomática caracteriza-se por sorologia positiva para leishmaniose com presença de pequenos sinais e sintomas da doença como febre, hepato ou esplenomegalia discretas. A forma clássica é a doença plenamente manifesta, caracterizada por manifestações clínicas bastante exacerbadas com hepatoesplenomegalia volumosa e febre obrigatoriamente presentes, podendo estar associadas à infecção bacteriana (Badaro et al.¹³). O curso da doença depende do balanço da resposta do hospedeiro a infecção: ou o sistema imunológico responde de uma forma eficaz e controla o parasito; ou o parasito escapa da resposta imunológica ocorrendo o desenvolvimento da doença (Sacks et al. Apud Warren¹²). Na forma clássica da LV tanto em humanos como em alguns modelos experimentais, a imunossupressão é uma das principais características (Carvalho et al.¹⁴ e Nickol e Bonventre¹⁵).

A resposta celular tanto em humanos como em modelos experimentais com LV pode ser avaliada pelo teste cutâneo de hipersensibilidade tardia antígeno específica e ainda através da proliferação de células mononucleares de sangue periférico, esplênicas ou de linfonodos, frente a antígenos (Ag) específicos ou a mitógenos (principalmente concanavalina A - ConA - e fitohemaglutinina). Estudos em humanos mostram que durante a evolução da leishmaniose visceral plenamente manifesta pode ocorrer imunossupressão mostrada pela ausência de resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico a Ag de *Leishmania* e mitógenos. Estes resultados são controversos, pois enquanto uns observam resposta proliferativa a fitohemaglutinina e ausência a antígeno de *Leishmania* (Carvalho et al.¹⁴), Ghose et al.¹⁶ observaram resposta proliferativa suprimida tanto a mitógeno quanto ao Ag de *Leishmania*.

Em modelo de camundongo infectado com *Leishmania donovani* a resposta imune frente a antígenos específicos e à mitógenos encontra-se preservada em todo o período de infecção. Este é um bom modelo para estudo de imunidade, porém não é ideal para estudo de imunossupressão, pois se observa progressão da infecção até 8 semanas, com posterior controle da proliferação do parasito (Barbosa Júnior et al.¹⁷, Murray e Hariprashad¹⁸ e Engwerda et al.¹⁹). Hamster infectado com *Leishmania (L.) donovani* ou *Leishmania (L.) chagasi* é um dos melhores modelos para estudo da imunossupressão (Goto e Lindoso²⁰), pois à semelhança da doença plenamente no homem, desenvolve as mesmas características clínicas e laboratoriais (Melleney²¹, Stauber²² e Bunn-Moreno et al.²²). Na avaliação da imunossupressão na LV neste animal os dados da literatura são controversos, pois são descritas diferentes respostas proliferativas frente à mitógeno e à Ag de *Leishmania*, tanto em células esplênicas como mononucleares de sangue periférico (Nickol e Bonventre¹⁵, Gifawensen e Farrell²⁴, Lindoso²⁵, Bunn- Moreno et al.²³ e Rodrigues Jr et al.²⁶). Essa diferença de resposta proliferativa está relacionada com a via de inoculação do parasito e também em relação à espécie de *Leishmania* envolvida.

Dentre os fatores descritos na literatura como responsáveis pela imunossupressão na LV, estão: a presença de células aderentes (Basak et al.²⁷), fator sérico supressor (Vasconcellos et al.²⁸ e Barral et al.²⁹), receptor solúvel de IL-2 (Barral-Netto et al.³⁰), defeito nas células apresentadoras de antígeno (Reiner et al.³¹ e Rodrigues Jr et al.²⁶), TGF- β (Rodrigues Jr et al.³³ e Barral-Netto et al.³³) que estaria inibindo a atividade do macrófago (Kehrl et al.³⁴ e Ding et al.³⁵), participação de moléculas co-estimulatórias (B7-1 ou B7-2) (Saha et al.³⁶), e ainda diminuição da produção de óxido nítrico (NO) (Melby et al.³⁷, Martins et al.³⁸ e Dasgupta et al.³⁹).

Entretanto, mesmo após a descrição de diversos fatores relacionados à imunossupressão, durante a doença plenamente manifesta, acredita-se que o mecanismo não esteja completamente esclarecido, podendo haver participação de outros fatores ou fenômenos pouco estudados até agora.

1.2 Perfil de citocinas

No estudo da imunidade nas leishmanioses, acredita-se que as formas clínicas estejam relacionadas ao estado imunológico do hospedeiro. Desta forma, um dos aspectos mais estudados é o perfil de citocinas produzidas pelos linfócitos T auxiliares (cel T CD4+). Dependendo do perfil da citocina produzida, pode-se ter o controle ou a progressão da infecção (Locksley e Scott⁴⁰).

Inicialmente acreditava-se que um perfil de citocinas Th1, com produção de IL-12, IFN- γ e IL-2, estariam presentes em quantidades suficientes para regular a resposta imunológica e ativar os macrófagos (Carvalho et al.⁴¹ e Skeiky et al.⁴²). Entretanto se quantidades excessivas de citocinas tipo Th2 fossem produzidas, tais como IL-4 e IL-10, haveria uma baixa ativação macrofágica e conseqüentemente o desenvolvimento das formas clínicas da doença (Ghalib et al.⁴³ e Karp et al.⁴⁴). Atualmente estudos clínicos e experimentais envolvendo algumas espécies de animais, vêm sendo utilizados em diferentes aspectos da LV, sem evidência detalhada dessa dicotomia da produção de citocinas.

Pacientes de área endêmica que tiveram conversão da sorologia para *Leishmania* e não desenvolveram a doença, expressaram um aumento da produção de

IFN- γ em células de cultura estimuladas com Ag de *Leishmania*; já em pacientes que desenvolveram a doença, a produção de IFN- γ apareceu diminuída (Carvalho et al.⁴⁵). Um estudo realizado por Squires et al.⁴⁶ com camundongos nude BALB/c infectados com *L. donovani*, demonstrou que o IFN- γ é importante na proteção da infecção da leishmaniose, através da ausência de formação do granuloma. Porém em outro estudo realizado por Murray et al.⁴⁷, há a formação do granuloma com a presença de IFN- γ , aparentemente induzido por IL-2.

Em relação à citocinas do tipo Th2, a IL-4 foi estudada por Zwingenberger et al.⁴⁸ evidenciando altos níveis em soro de pacientes com LV ativa, entretanto não há evidências de que esta citocina esteja envolvida na diminuição da resposta Th1. Um estudo detectou a presença de IL-4 na fase intermediária da infecção coincidindo com a replicação do parasito, em cepa susceptível de camundongo à *Leishmania (L) donovani*; e não detectou a produção desta citocina em camundongos com cepas resistentes (Saha et al.⁴⁹).

Os estudos de Ghalib et al.⁴³ e Carvalho et al.⁴¹ demonstraram: (1) a IL-12 está diminuída em sobrenadante de células mononucleares estimuladas in vitro com Ag de *Leishmania* de pacientes com LV ativa; (2) um aumento da expressão de IL-10 em células de medula óssea e linfonodo; (3) altos níveis de IL-10 em sobrenadante de células mononucleares estimuladas com antígeno de *Leishmania*. Acredita-se assim que a IL-10 está relacionada à progressão da LV humana (Karp et al.⁴⁴).

Outra citocina importante é a TGF- β . Foi detectado o aumento de sua produção tanto em leishmaniose cutânea quanto em leishmaniose visceral

experimental em hamster e em camundongo infectados por *Leishmania (L.) donovani* (Barral et al.³³ e Rodrigues Jr et al.²⁶). Wilson et al.⁵⁰ também demonstraram por ensaio de neutralização que o TGF- β inibe a produção de IFN- γ .

No modelo de hamster, que melhor representa a imunossupressão observada durante a fase ativa de doença, o perfil de citocinas produzidas parece não obedecer a um padrão que seria responsável pelo controle ou progressão da infecção, pois ocorre produção tanto de citocinas do padrão Th1 (IFN- γ), quanto Th2 (IL-4 e IL-10) (Melby et al.⁵¹ e Lindoso²⁵).

1.3 Óxido nítrico

Na instalação da leishmaniose, após a fagocitose do parasito ocorre um aumento do burst (consumo) de oxigênio pelas células fagocíticas, que através da enzima NADPH oxidase ou iNOS (sintase induzível do NO) geram produtos reativos de oxigênio como H₂O₂ e NO (Bogdan et al.⁵², Bogdan e Rollinghoff⁵³, Murray e Nathan⁵⁴ e Stuehr et al.⁵⁵). Adicionalmente citocinas derivadas de células T do padrão Th1, como IFN- γ e IL-2, induzem transcrição de iNOS (Cunha et al.⁵⁶, Taylor-Robinson et al.⁵⁷ e Dussé⁵⁸). Além de IFN- γ , TNF- α e IL-1 também induzem a síntese e liberação de NO pelo macrófago, acredita-se que o IFN- γ produzido pelo linfócito T, ativa esta via no macrófago instalando uma alça de retroalimentação (Bohlke⁵⁹).

O NO é considerado o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune

(Hibbs et al.⁶⁰, Dusse⁵⁸ e Flora Filho e Zilberstein⁶¹). Na LV, o óxido nítrico dentro do macrófago é considerado um importante leishmanicida, através de sua ação citotóxica e citostática promovem a destruição da *Leishmania*, auxiliando assim no controle da infecção (Romão et al.⁶², Liew et al.⁶³, Wei et al.⁶⁴ e Stenger et al.⁶⁵). Porém quando excretado está envolvido na modulação de numerosos processos na citotoxicidade por macrófagos ativados, na migração celular, na ativação de fatores de transcrição e inclusive na proliferação celular (Nathan⁶⁶).

A ativação de macrófagos induzida por IFN- γ resulta em alterações na função macrofágica incluindo expressão de receptores para antígeno do MHC-II, processamento e apresentação de antígeno e liberação de IL-1, os quais são associados com o aumento da proliferação de células T. Estes efeitos pró-proliferativos podem predominar quando macrófagos e linfócitos interagem em razões e proporções ótimas, porém se um grande número de macrófagos é estimulado simultaneamente por IFN- γ , isoladamente ou em combinação com outras citocinas, a produção resultante de óxido nítrico provavelmente é supressiva para células T do local (Albina et al.⁶⁷).

O óxido nítrico age inativando enzimas necessárias à função da mitocôndria (Drapier e Hibbs⁶⁸) e causando aumento da quebra do DNA (Nguyen et al.⁶⁹) o que resulta na ativação de enzimas como ADP-ribosiltransferase e conseqüentemente anergia e morte celular (Zhang et al.⁷⁰). O NO também pode induzir o acúmulo de p53, um proto-oncogene cujo produto induz apoptose em vários tipos celulares (Schwartz e Osborne⁷¹, Messmer⁷² e Martins et al.³⁸).

1.3 Apoptose de linfócitos

O fenômeno da apoptose é descrito em várias infecções influenciando o seu desenvolvimento. Em pacientes com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, a apoptose de células T CD4⁺ foi relacionada à destruição destas células ao longo da infecção (Ameisen et al.⁷³, Groux et al.⁷⁴ e Roger et al.⁷⁵). Descreve-se também a apoptose de células T em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* (Estaquier et al.⁷⁶); em pacientes com malária por *Plasmodium falciparum* (Toure-Balde et al.⁷⁸; Balde et al.⁷⁸); em camundongos com toxoplasmose disseminada e ocular (Hu et al.⁷⁹, Khan et al.⁸⁰); e em células esplênicas de doença de chagas experimental (Lopes et al.⁸¹).

Em leishmaniose, a apoptose é descrita como fator que pode participar da imunopatogenia da doença. Na leishmaniose cutânea, camundongos deficientes de Fas e Fas ligante não controlam a infecção por *Leishmania (L) major* (Conceição-Silva et al.⁸² e Huang et al.⁸³) sugerindo a participação de apoptose no mecanismo de proteção da infecção. Já em humanos Bertho et al.⁸⁴ analisando lesões com doença progressiva e com cura espontânea, mostram que a apoptose em células T CD4⁺ e CD8⁺ possam ter papéis diferentes no desenvolvimento ou na cura das lesões. Em camundongos com LV é descrito o aumento de apoptose de células TCD4⁺ que poderiam contribuir para a imunossupressão e desenvolvimento da doença (Das et al.⁸⁵).

Na LV a imunossupressão que ocorre durante a instalação da infecção é descrita em humanos e em animais. Apesar de haver diversos fatores, principalmente do hospedeiro, relacionados com a imunossupressão, o mecanismo não está

totalmente esclarecido, nem o momento em que a imunossupressão se instala. Neste estudo, no modelo que melhor representa (in vivo) o que ocorre na doença humana plenamente manifesta, procuramos entender a dinâmica da instalação da imunossupressão na LV. Estudamos em tempos precoces, intermediários e tardios da infecção a presença de fatores que poderiam contribuir diretamente para este processo. Desta forma, produção de citocinas e avaliação da apoptose em células esplênicas foram os principais fatores aqui avaliados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Avaliar a cinética da imunossupressão na leishmaniose visceral experimental em hamsteres infectados por *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*.

Mais especificamente, avaliar a imunossupressão em fase precoce (6, 20, 48 e 72 horas), intermediária (7 e 15 dias) e tardia (30 e 60 dias) de infecção, através de:

- Resposta proliferativa de células esplênicas frente à mitógenos (concanavalina A) e antígeno de *Leishmania*;
- Perfil de citocinas produzidas pelas células esplênicas de hamsteres estimuladas com mitógeno e antígeno de *Leishmania*;
- Produção de óxido nítrico por células esplênicas estimuladas com mitógeno e antígeno de *Leishmania*;
- Detecção de apoptose em células esplênicas não aderentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e parasitos

3.1.1 Animais

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) não isogênicos, machos, de 45 a 60 dias de idade foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos no Biotério Experimental do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em ambiente com ventilação natural, com ração (Purina, Brasil) e água à vontade.

3.1.2 Parasitos

Leishmania (Leishmania) chagasi (MHOM/BR/72/cepa 46) foi mantida em hamsteres com inoculações intraperitoneais de homogeneizado de baço de animais infectados.

3.1.3 Purificação de amastigotas

Para inoculação em animais utilizados nos experimentos, hamsteres com aproximadamente 2 a 3 meses de infecção foram sacrificados em câmara de CO₂ e o baço retirado assepticamente e homogeneizado, sendo as amastigotas purificadas segundo Dwyer⁸⁶ modificado. Resumidamente: os baços foram homogeneizados em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, EUA) frio e a suspensão celular foi deixada por 10 minutos em gelo para sedimentação de fragmentos tissulares, filtrada em gaze,

passada quatro vezes por agulha fina (24G) e centrifugada a 250 x g por 10 minutos por duas vezes. O sobrenadante resultante foi centrifugado a 2100 x g por 15 minutos e o sedimento ressuspense em meio RPMI 1640, sendo ajustada a concentração de parasitos para 2×10^7 /mL de meio RPMI 1640.

3.2 Desenho de estudo

Hamsteres (*Mesocricetus auratus*) infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* (MHOM/BR/72/cepa 46) e após 6, 20, 48 e 72 horas; 7, 15, 30 e 60 dias de infecção foram sacrificados sob anestesia (20mg/kg de cloridrato de cetamina e 5mg/kg de cloridrato de xilazina 2%) e o baço removido assepticamente. Fragmentos de baço foram utilizados para determinação da carga parasitária e a suspensão de células esplênicas, estimuladas com mitógeno e Ag de *Leishmania*, foi utilizada para avaliação de resposta proliferativa, produção de nitrito, perfil de citocinas e detecção de morte celular por apoptose (figura 1). Células esplênicas ex-vivos foram utilizadas para determinação do perfil de citocinas e detecção de morte celular por apoptose (figura 1). Para cada tempo de infecção foram mantidos animais controles, inoculados com meio de cultura 199 (LGC, Brasil). Como controle da resposta proliferativa antígeno-específica hamsteres foram imunizados com antígeno de *Leishmania* e adjuvante incompleto de Freund.

Figura 1. Desenho de estudo. Hamsteres não-infectados foram inoculados com amastigota de LLC e com Ag de LLC. A suspensão celular do baço em tempos iniciais, intermediários e tardios de infecção foi utilizada para análise com estímulo (proliferação celular, dosagem de nitrito, perfil de citocinas e presença de apoptose) e análise ex-vivo (perfil de citocinas e presença de apoptose). Em todos os tempos de infecção foi avaliada a carga parasitária em baço.

3.3 Determinação da carga parasitária em baço - segundo Stauber²²

Os baços retirados assepticamente de hamsteres com tempos de infecção (6, 20, 48, 72 horas; 7, 15, 30 e 60 dias) foram pesados e realizados “*imprints*” por aposição do fragmento do órgão em lâminas de vidro, fixados com metanol (Merck, EUA) durante dois minutos e posteriormente realizados coloração com giemsa por trinta minutos. Foi realizada a contagem de cem parasitos ou cem células e a carga parasitária no órgão foi calculada segundo a fórmula:

$$\frac{\text{numero de parasitos}}{\text{número de células}} \times \text{peso do órgão (em mg)} \times 2 \times 10^4$$

3.4 Suspensão de células esplênicas

O baço foi removido assepticamente e homogeneizado em placa de Petri com auxílio de tecido fino. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado em gaze estéril e a suspensão centrifugada a 250 x g por dez minutos a 25°C. Foi feita a lise das hemácias com cloreto de amônio 2% em água destilada por dois minutos e imediatamente equilibrada a osmolaridade com solução salina tamponada com fosfato (PBS) dez vezes concentrada 0,01M. Após três lavagens com meio de cultura RPMI 1640 (LGC, Brasil), a concentração celular foi ajustada para 2×10^7 /mL, ressuspensa em meio RPMI 1640 com 10mM de HEPES, 100UI/mL de benzilpenicilina, 10µg/mL de gentamicina, 2mM de L-glutamina, 10µM de 2-mercaptoetanol (Sigma, EUA) e 1,0% de soro de hamster (SH) inativado pelo calor (em banho maria de 56°C por 50 minutos).

3.5 Proliferação de células esplênicas

10^6 células esplênicas foram incubadas com c ConA (Amersham-Pharmacia, Suécia) na concentração de 0,5 µg/mL ou Ag bruto de *Leishmania (L.) chagasi* na concentração de 5×10^7 parasitos/mL em triplicata; a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 72 horas. Seis horas antes do término da cultura, as células foram pulsadas com 0,5 µCi de timidina marcada com trício (Amersham Pharmacia,

Suécia). A coleta celular foi realizada no cell-harvester (Titertech, EUA) e a leitura em contador beta (Packard, EUA). A partir dos resultados expressos em média de triplicata de cintilação por minuto (cpm) foi calculado o índice de proliferação celular (média da cpm de células estimuladas /média da cpm de células incubadas com meio de cultura).

Animais imunizados com 2×10^7 antígeno total de LLC em 1mL de adjuvante incompleto de Freund (sigma, EUA) foram utilizados como controle positivo da proliferação ao antígeno de *Leishmania*. As inoculações foram de 0,5mL em cinco pontos diferentes do dorso dos hamsteres não infectados; uma vez por semana durante três semanas seguidas. Como controle, animais foram inoculados somente com adjuvante incompleto de Freund. A avaliação da resposta imune de animais imunizados foi realizada um mês após a última inoculação.

3.6 Determinação do perfil de citocinas produzido pelas células esplênicas

3.6.1 Extração, purificação e quantificação de RNA total

Foram extraídos RNA de células esplênicas de hamsteres infectados (fase inicial, intermediária e tardia) e não infectados; assim como de células esplênicas estimuladas 24 horas com ConA e Ag bruto de LLC, nos mesmos tempos de infecção, para análise do perfil de citocinas produzido. A suspensão celular foi incubada com 1mL de reagente TRIZOL (Gibco, EUA) e adicionado 200 µL de clorofórmio, sendo feita agitação vigorosa. Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a $3200 \times g$, por 15 minutos a 4°C; então coletada a fase aquosa e misturada volume a volume com isopropanol. As amostras foram incubadas

por 30 minutos a temperatura ambiente, lavadas e acrescido etanol absoluto. Após nova lavagem o sedimento foi seco por 10 minutos e ressuspenso em 50µL de água livre de RNase (0,1% de dietil pirocarbonato – DEPC em água ultra pura). A avaliação da qualidade do RNA total extraído foi realizada através de análise de integridade e pureza das amostras no aparelho NanoDrop (NanoDrop Technologies, EUA) e em corrida em gel de agarose 0,8% em tampão de corrida TAE (Tris base 40 mM, EDTA 2 mM em água bidestilada) 0,05% DEPC. A coloração do gel foi realizada com brometo de etídio (0,5 µg/mL) por 40 minutos e a revelação em câmera fotográfica digital.

3.6.2 Obtenção de cDNA a partir de RNA por transcrição reversa

Trezentos ng/µL da amostra de RNA obtido juntamente com 0,5 µg/µL de oligo dT 12-18 primer (Invitrogen, EUA), 50 ng/µL de random primers (Fermentas, União Européia) e 12µL de água livre de RNase foram submetidas ao termociclador (Mastercycle Gradient Eppendorf, Alemanha) a uma temperatura de 75°C por 5 minutos e 25°C por 5 minutos. Foram então acrescidos às amostras, 4µL de solução tampão [5X] (250nM de Tris-HCl, 375mM de KCl e 15mM de MgCl₂) (Invitrogen, EUA), 0,2M de DTT (Invitrogen, EUA), 40 unidades de RNase out, 10mM de dNTPs (Invitrogen, EUA) e 200 unidades de transcriptase reversa (Invitrogen, EUA). As amostras foram submetidas a um ciclo de 37°C por 50 minutos, 70°C por 15 minutos e deixadas a 4°C no termociclador (Mastercycle Gradient Eppendorf, Alemanha) até o armazenamento em freezer -20°C. Para avaliar a qualidade do cDNA (DNA complementar) obtido, foi realizada análise de integridade e pureza das amostras no aparelho NanoDrop (NanoDrop Technologies, EUA). As amostras cujo

parâmetro 260/280 apresentou-se entre 1.7 e 2.0 foram separadas para posterior reação de PCR.

3.6.3 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Foi preparado a mistura (MIX) contendo 10mM de dNTPs (Invitrogen, EUA), 2,5µL de solução tampão 10X (Fermentas, União Européia), 0,1unid/µL de MgCl₂ (Fermentas, União Européia), 2,5 µM de primers (*forward* e *reverse*), 0,75 unid/µL da enzima Taq DNA polimerase recombinante (Fermentas, União Européia) e água estéril. Vinte de dois µL do MIX juntamente com 3µL da amostra de cDNA foram submetidas ao termociclador (Mastercycle Gradient Eppendorf, Alemanha) à 95°C por 5 minutos, 50°C por 2 minutos e 70°C por 2 minutos; posteriormente 36 ciclos de 94°C por 1 minutos, 50°C por 2 minutos (temperatura de anelamento de acordo com temperatura de melting dos primers - tabela 1) e 70°C por 2 minutos; finalizando à 72°C por 10 minutos e 4°C até o armazenamento em geladeira ou corrida em gel de agarose.

Tabela 1. Primers RT-PCR. Sequência, tamanho, porcentagem de CG e temperatura de *melting* dos primers para RT-PCR.

Primer		Sequência	Tamanho (pb)	CG (%)	TM (°C)
HPRT	Forward	CCA CGC CTA CTA TAG AGT TTG	21	48	46.4
	Reverse	CTT GCG ATG TCA TGG TAG AG	20	50	60
IFN-γ	Forward	TCA TTG AGA GCC AGA TCG TC	20	50	60
	Reverse	GGC TAA GTT TTC GTG ACA GG	20	50	60
TGF-β	Forward	GAG AAG AAC TGC TGT GTG CG	20	55	62
	Reverse	AAC CAC GTA GTA CAC GAT GG	20	50	60
TNF-α	Forward	CAC ATT CCT CTT CTG CCT GC	20	55	62
	Reverse	TGT CTT TGA GAG ACA TCC CG	20	50	60
IL-10	Forward	GGA CAA CAT ACT ACT CAC TG	20	45	58
	Reverse	ACA GGG GAG AAA TCG ATG AC	20	50	60
IL-4	Forward	TCC TAT CAC TGA CGG TAG AG	20	50	60
	Reverse	TGC AAA TGA GGT CTT TCT CC	20	45	58
IL-2	Forward	AAC CCA GCA GCA CCT CGA GC	20	65	66
	Reverse	CAG TTA CTG TCT CAT CAT CG	20	45	58

A visualização da banda foi realizada através de corrida em 2% gel de agarose em tampão de corrida TAE (Tris base 40 mM, EDTA 2 mM em água bidestilada), posterior coloração com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e revelação com câmera digital.

3.7 Dosagem de nitrito em sobrenadante de células esplênicas estimuladas

Em placas de poliestireno (Costar) de 24 poços, 2×10^7 células esplênicas foram estimuladas com 0,5 μ g/mL de ConA e com 5×10^7 parasitos/mL de Ag bruto de LLC. Após 24 horas de incubação a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, o sobrenadante foi coletado para dosagem de nitrito pelo método de Griess modificado (Green et al.⁸⁷). Resumidamente, 100 μ L do sobrenadante foram distribuídos em placas de 96 poços, acrescido de igual volume do reagente de Griess

(1% de sulfanilamida, 0,1% de diamino naftaleno diidrocloreto, 2% de ácido fosfórico em água destilada estéril, quantidade suficiente para 100 mL) e incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. A concentração de nitrito foi determinada usando nitrito de sódio (NaNO_2) como padrão e meio de cultura RPMI 1640. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica a 540nm em aparelho Multiskan MCC/340 P versão 2.20 (Labsystems, Finlândia).

3.8 Detecção de apoptose em células esplênicas não-aderentes

3.8.1 Detecção de fragmentação de DNA- Método TUNEL

Foi utilizado um kit específico para detecção de apoptose pelo método TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling) em suspensão celular, seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante (Roche Diagnostics, Germany). A suspensão de células esplênicas ex-vivo e estimuladas com ConA ou com Ag LLC, de hamsteres normais e infectados, foram lavadas com PBS-albumina de soro bovino (BSA) 1% por 2 vezes a 4°C, sendo em seguida fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem das células com PBS por duas vezes, as mesmas foram permeabilizadas com solução de 0,1% de Triton X-100 (Sigma, EUA) em citrato de sódio 0,1% em água ultra pura (pH 7,4) por 2 minutos em gelo. As células sofreram nova lavagem com PBS-BSA e incubação com solução contendo dUTP conjugado com fluoresceína e enzima “terminal deoxinucleotidil transferase” (TdT) durante 60 minutos, protegido da luz. Em seguida foram ressuspensas em 500 μL de PBS e feita análise em citometria de fluxo (FacsComp-BD Biosciences, EUA) de 10.000 eventos.

Como controle negativo foram usadas células incubadas com a solução contendo dUTP conjugado com fluoresceína, sem TdT. A análise das amostras foi realizada em janela de células não-aderentes no programa Cell Quest (Beckton Dikson, EUA).

3.8.2 Detecção de exposição de fosfatidilserina - Método de anexina V

Suspensão de células esplênicas ex-vivo e estimuladas in vivo com ConA ou Ag bruto de *Leishmania* foram analisadas para detecção de apoptose através da exposição de fosfatidil serina, por ligação a Anexina V conjugada a fluoresceína (Anexina V-FITC), segundo protocolo do fabricante (BD Pharmingen, EUA). Resumidamente, 10^6 células foram incubadas com anexina V conjugada com isoticianato de fluoresceína (FITC) e acrescidas de iodeto de propídeo (PI). Após duas lavagens com PBS 0,01M pH 7,2, as células foram ressuspensas em 500µL de PBS com 1% de albumina bovina (BSA) e analisados 10.000 eventos por citometria de fluxo (FacsComp-BD Biosciences, EUA). No programa Cell Quest (Beckton Dikson, EUA) foi avaliada a janela para células esplênicas não-aderentes.

3.8.3 Detecção da caspase 3 clivada – ASP 175

Suspensão de células esplênicas ex-vivo e estimuladas in vivo com ConA ou Ag de *Leishmania* foram analisadas para detecção de apoptose através da clivagem da caspase 3, seguindo-se protocolo do fabricante (Cell Signaling, EUA). Resumidamente, 10^6 células foram fixadas com 1,5% de formaldeído por 10 minutos à 37°C. Após lavagem com PBS e centrifugação a 250 x g por 10 minutos, as células foram permeabilizadas por 30 minutos à 4°C com 90% de metanol gelado em PBS.

Após duas lavagens foi realizada a marcação das células com 90 µL de PBS-BSA (0,5g de BSA em 100mL de PBS) por 10 minutos em temperatura ambiente seguido e acrescido 10µL do anticorpo conjugado (Anticorpo anti-caspase 3 clivada-ASP175 conjugado com Alexa Flúor-488) na diluição de 1:10, incubadas por 50 minutos a temperatura ambiente, privado de luz. Após nova lavagem, as células foram ressuspensas em 500 µL de PBS e analisados 10.000 eventos por citometria de fluxo (FacsComp-BD Biosciences, EUA). No programa Cell Quest (Beckton Dikcson, EUA) foi avaliada a janela para células esplênicas não-aderentes.

3.9 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad Prism (versão 3.02) utilizando o teste ANOVA e o método não paramétrico de Kruskal-Wallis.

3.10 Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP - CAPPesq (apêndice 1), obedecendo os preceitos de ética em pesquisa animal.

RESULTADOS

4 Resultados

4.1 Evolução da carga parasitária em baço

Hamsteres infectados intraperitonealmente com 2×10^7 amastigotas de LLC apresentaram aumento progressivo da carga parasitária no baço (figura 2). No início da infecção (6 horas) a média da carga parasitária foi de $5,67 \times 10^4 \pm 2,81$ (n=3), com aumento para $16,91 \times 10^4 \pm 3,04$ (n=7) após 20 horas de infecção. Aos sete dias de infecção a média da carga parasitária foi de $32,67 \times 10^4 \pm 5,76$ (n=4). Foram observadas médias ainda maiores nos tempos tardios de infecção, $61,30 \times 10^4 \pm 16,63$ (n=4) aos 30 dias e de $130,97 \times 10^4 \pm 24,28$ (n=4) aos 60 dias de infecção.

Figura 2. Carga parasitária. Carga parasitária $\times 10^4$ (media $\pm$ desvio padrão) do baço de hamsteres infectados com 2×10^7 amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*; em tempos precoces (6, 20, 48 e 72 horas), intermediários (7 e 15 dias) e tardios (30 e 60 dias) de infecção.

4.2 Proliferação de células esplênicas

4.2.1 Padronização da concentração de concanavalina A e antígeno de *Leishmania*

Uma vez confirmado o desenvolvimento da doença neste modelo experimental, partimos para avaliação da resposta proliferativa de células esplênicas de hamsteres frente a ConA e Ag total de *Leishmania*, como possível marcador de imunossupressão. Após experimentos variando-se a origem e a concentração de soro utilizado (SH; ou soro fetal bovino - SFB); assim como a concentração ideal de concanavalina A em células esplênicas de hamsteres não infectados, definimos os seguintes parâmetros para uso nos experimentos: concentração de soro de 1% de SH fresco e concentração de concavalina A de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (figura 3).

Figura 3. Padronização de soro e mitógeno. 2×10^5 células esplênicas foram estimuladas por 72 horas com concentrações variadas de concanavalina A em meio RPMI 1640 completo com 0,5; 1,0 ou 2,0% de SFB ou SH, inativado pelo calor, de animais não infectados. Os resultados são expressos em índice de proliferação (média de cpm das amostras estimuladas com ConA/média de cpm das amostras incubadas somente com meio) e desvio padrão. A média dos resultados de cpm de células estimuladas com meio de cultura e com 0,5; 1,0 e 2,0% de SFB são respectivamente 185,75; 4365,25 e 166,85. A média dos resultados de cpm de células estimuladas com meio de cultura e com 0,5; 1,0 e 2,0% de SH são respectivamente 174,25; 196,65 e 125,60. Seta indicando os parâmetros escolhidos.

Para determinação da concentração de Ag de LLC a ser utilizado nos experimentos de resposta proliferativa antígeno-específica, hamsteres foram imunizados com antígeno bruto de *Leishmania* e adjuvante incompleto de Freund. Células esplênicas foram então estimuladas com 0,5 µg/mL de ConA ou com Ag bruto de LLC, em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação. Animais imunizados com adjuvante incompleto de Freund e antígeno de LLC

apresentaram resposta proliferativa a ConA ou Ag de *Leishmania* após 72 horas de cultura (figura 4A), não havendo resposta após 96 horas de estímulo (figura 4B). Nos grupo controles, imunizados com Ag de *Leishmania* ou com adjuvante incompleto de Freund, houve resposta proliferativa somente após 72 horas de incubação, com ConA; não havendo resposta a Ag de LLC (figura 4A). Diante destes resultados padronizamos o uso de 5×10^7 /mL de Ag de *Leishmania* com 72 horas de incubação para avaliação de resposta proliferativa antígeno-específica nos grupos de hamsteres infectados com *Leishmania (L.) chagasi* nos tempos precoces, intermediários e tardios de infecção.

Figura 4. Padronização da concentração de antígeno de *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. 2×10^7 células esplênicas de hamsteres inoculados com meio de cultura; com adjuvante incompleto de Freund; com Ag de *Leishmania* ou com Ag de *Leishmania* em adjuvante incompleto de Freund foram estimuladas com ConA (0,5 µg/mL) ou Ag de LLC (5×10^6 e 5×10^7 promastigotas de *Leishmania* (*L.*))

chagasi/mL) em meio RPMI 1640 completo com 1% de SH inativado pelo calor. Incorporação de timidina triciada foi avaliada após 72 horas (**A**) e 96 horas (**B**) de incubação do mitógeno e antígeno de *Leishmania* e os resultados expressos em índice de proliferação (média da cpm das amostras estimuladas com mitógeno /média da cpm das amostras incubadas somente com meio de cultura) e desvio padrão.

4.2.2 Avaliação da resposta proliferativa frente à mitógeno e antígeno específico

Como havíamos padronizado as condições ideais para avaliação de resposta proliferativa frente à Con A e Ag LLC partimos para avaliação da imunossupressão nos grupos experimentais. Observamos resposta proliferativa preservada frente à ConA, em todos os tempos de infecção (figura 5A). Porém a cinética da resposta frente ao Ag bruto de LLC apresentou-se diferente, com ausência de resposta nos tempos precoces de infecção (6 e 20 horas). Com 48 e 72 horas de infecção houve resposta proliferativa frente ao antígeno total de *Leishmania* e ausência de resposta proliferativa a partir de sete dias de infecção (Figura 5B).

Figura 5. Proliferação de células esplênicas de hamsteres. 2×10^7 células esplênicas de hamsteres infectados com *Leishmania (L.) chagasi* foram estimuladas por 72 horas com $0,5 \mu\text{g/mL}$ ConA (A) e 5×10^7 promastigotas de *L. (L.) chagasi*

/mL de Ag bruto de *Leishmania* (**B**) em meio RPMI 1640 completo (10mM de HEPES, 100UI/mL de benzilpenicilina, 10µg/mL de gentamicina, 2mM de L-glutamina, 10µM de 2-mercaptoetanol (Sigma) e 1,0% de soro de hamster inativado pelo calor). Tempos de infecções iniciais (6, 20, 48 e 72 horas), intermediários (7 e 15 dias) e tardios (30 e 60 dias). Os resultados são expressos em índice de proliferação (média da triplicata de cpm das amostras estimuladas /média da triplicata de cpm das amostras incubadas com meio de cultura) e media.

4.3 Perfil de citocinas produzido pelas células esplênicas

Uma vez observada resposta proliferativa preservada frente à concanavalina A e imunossupressão instalada a partir de sete dias de infecção, fomos avaliar o perfil de citocinas produzido pelas células esplênicas, na tentativa de definir o padrão de resposta celular presente (Th1 e Th2). Como não há marcadores específicos para citocinas de hamsteres, avaliamos qualitativamente a produção de RNA mensageiro das citocinas nos vários tempos de infecção; ex-vivo e sob estímulos.

Embora as amostras de RNA total extraídas apresentassem contaminação por sais, polissacarídeos e por compostos orgânicos como o fenol, observada através do pico de absorbância de 230 wavelenght (figura 6), estavam dentro dos parâmetros de pureza (relação 260/230 e 126/280), possibilitando a reação de transcrição reversa.

Figura 6. Pureza das amostras de RNA total. Avaliação em nano drop das amostras de RNA extraídas de células esplênicas de hamsteres, com e sem estímulos.

Depois de verificada a pureza das amostras de DNA complementar, também através do nanodrop, foi realizada a reação em cadeia da polimerase. Observamos que as células esplênicas de animais controle e de infectados produzem o mesmo perfil de citocinas, não havendo dicotomização de resposta celular Th1 e Th2. Em todos os tempos de infecção ressalta banda forte de TGF beta, assim como nos animais controle (figura 7). Os mesmo padrões foram observados em células esplênicas com estímulos nos diversos tempos de infecção (figura 8) tanto em células de animais controle, como de animais infectados, nos vários tempos.

Figura 7. Bandas de citocinas de células esplênicas ex-vivo. Produto amplificado por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) de HPRT e citocinas de RNA mensageiro de células esplênicas de hamsteres infectados e grupo controle. RNA foi purificado de células ex-vivo. Produto de PCR analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. **P.** peso molecular; **1.**HPRT; **2.** TNF- α ; **3.** TGF- β ; **4.** IL-2; **5.** IL-4; **6.** IL-10 e **7.** IFN- γ . HPRT=hipoxantina fosforibosiltransferase.

Figura 8. Banda de citocinas de células esplênicas estimuladas. Produto amplificado por reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) de HPRT e citocinas de RNA mensageiro de células esplênicas de hamsteres infectados e grupo controle. RNA foi purificado de células estimuladas com concanavalina A ou antígeno de Leishmania. Produto de PCR analisado por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio. **P.** peso molecular; **1.**HPRT; **2.** TNF- α ; **3.** TGF- β ; **4.** IL-2; **5.** IL-4; **6.** IL-10 e **7.** IFN- γ . HPRT=hipoxantina fosforibosiltransferase.

4.4 Produção de óxido nítrico por células esplênicas estimuladas

Como não encontramos diferença na produção de citocinas entre os vários tempos de infecção e em animais controles, fomos avaliar se a produção de óxido nítrico poderia estar relacionada com imunossupressão antígeno-específica. As concentrações de nitrito avaliadas refletem a produção de óxido nítrico produzidas pelas células, determinado pelo nitrito de sódio (NaNO_2) 100 μM e 400 μM como padrões. Estas curvas apresentaram-se perfeitas, ambas com $R^2=1$, portanto, não havendo duvidas nos resultados obtidos nas amostras (figura 9).

Figura 9. Curva padrão de produção de nitrito. Após diluição seriada de 100 μM (A) e 400 μM (B) de nitrito de sódio as amostras foram dosadas por espectrofotometria. Valores de densidade óptica da amostra subtraída de densidade óptica de branco e concentração em μM olar.

Nos sobrenadantes de células esplênicas de hamsteres estimuladas, observamos pouca produção de nitrito a 0,1 μM em todos os tempos de infecção

avaliados (20, 48, 72 horas; 7 e 30 dias). Nas células esplênicas estimuladas com concanavalina A não houve variação na produção do óxido nítrico (figura 10A). Porém, em sobrenadante de células esplênicas estimuladas com antígeno de LLC a produção de nitrito apresentou-se diminuída com 48 e 72 horas de infecção quando comparada ao tempo mais precoce de 20 horas de infecção, sem diferença significativa. Com sete dias de infecção, a produção de nitrito aumenta um pouco, seguida de platô até os 30 dias de infecção (figura 10B).

Figura 10. Produção de nitrito em sobrenadante celular. Média da dosagem de nitrito em sobrenadantes de 10^6 células esplênicas de hamsteres infectados com LLC estimuladas 24 horas com $0,5 \mu\text{g/mL}$ concanavalina A (**A**) e com 5×10^7 parasitos/mL de antígeno bruto de LLC (**B**). Células de animais infectados, incubadas com meio de cultura foram utilizadas como controle da reação.

4.5. Avaliação da apoptose em células esplênicas não aderentes

Como não observamos dicotomização da resposta celular pelo perfil de citocinas produzidas, procuramos outro possível mecanismo de imunossupressão. Desta forma partimos para avaliação da apoptose em células esplênicas não-aderentes ex-vivo e sob estímulos.

Na análise populacional, por citometria de fluxo, de células esplênicas de hamster infectado por LLC, sem estímulo, podemos observar três populações celulares (figura 11A) R₁ com 38,63%, R₂ com 17,81% e R₃ com 23,56% do total de células. Estas mesmas populações estão presentes com características de tamanho e complexidade diferentes quando estimuladas com concanavalina A (figura 11B), R₁ com 28,82%, R₂ com 26,14% e R₃ com 24,53% do total de células das células.

Em amostra de homogeneizado de baço em que o sobrenadante foi retirado após estímulo de 24 horas de ConA observamos diminuição de células na janela R₂ com apenas 6,84% do total de células esplênicas em contrapartida R₁ apresentou 32,90% e R₃ com 34,60% do total de células (Fig 11C). Consideramos assim, a janela R₂ de células esplênicas não-aderentes, onde a maioria das células são linfócitos.

Figura 11. Populações celulares. Determinação da região de localização de células aderentes (prováveis macrófagos) e não aderentes (prováveis linfócitos) por citometria de fluxo. Células esplênicas ex-vivo ou estimuladas por 24 horas com concanavalina A foram analisadas por citometria de fluxo para determinação das regiões das células. **A.** células esplênicas ex-vivo. **B.** células esplênicas estimuladas com concanavalina A e **C.** células esplênicas estimuladas com concanavalina A e posterior retirada de células não aderentes. **R₁** prováveis polimorfonucleares, **R₂** prováveis linfócitos (células não aderentes) e **R₃** prováveis macrófagos (células aderentes). Foram analisados 10.000 eventos pelo citometro.

A caracterização das células esplênicas não-aderentes por citometria de fluxo permitiu a avaliação da presença de morte celular pelos métodos de ligação da anexina V à fosfatidilserina com marcação do iodeto de propídeo; pela fragmentação de DNA (TUNEL); e pela detecção da caspase 3 clivada.

4.5.1 Em células esplênicas não-aderentes ex-vivo

Detecção da fragmentação de DNA (método do TUNEL)

Foi detectada a fragmentação do DNA das células não aderentes do baço de hamster nos tempos precoces de infecção. Hamsteres inoculados com meio de cultura foram utilizados como controle. A avaliação foi realizada em quatro animais com 20 e 48 horas de infecção e em três animais com 72 horas de infecção e controle, sendo em todos contados 10.000 eventos. Os resultados mostram uma baixa marcação de TUNEL em todos os tempos analisados (tabela 2). Embora a marcação

para TUNEL em tempos precoces de infecção seja baixa, pode-se observar no histograma uma marcação maior nos tempos de 20 e 48 horas de infecção (figura 12).

Tabela 2. Porcentagem de detecção de apoptose em células esplênicas não-aderentes ex-vivos, de hamsteres infectados e controle, pelo método TUNEL. Resultados expressos em média de porcentagem e desvio padrão.

Tempos de Infecção	TUNEL (+)
controle (n=3)	1,46% $\pm$ 0,42
20 horas (n=4)	1,55% $\pm$ 1,99
48 horas (n=4)	2,52% $\pm$ 0,80
72 horas (n=3)	1,26% $\pm$ 0,77

Figura 12. Detecção de apoptose em células esplênicas ex-vivo. 10^6 células esplênicas de hamsteres nos tempos de infecção de 20, 48 e 72 horas e de animal

controle foram analisadas para detecção de fragmentação de DNA. Células foram marcadas pelo método TUNEL e feita leitura de 10.000 eventos em citometria de fluxo e análise em janela de células não aderentes no programa Cell Quest. Histograma representando a análise de um animal para cada tempo de infecção. Resultados expressos em porcentagem de fluorescência.

Deteção da exposição de fosfatidilserina

Foi detectada a exposição de fosfatidilserina da membrana celular através da ligação à anexina V conjugado com FITC juntamente com marcação do iodeto de propídio, em células não aderentes do baço de hamster nos tempos precoces, intermediário e tardio de infecção por LLC e animais controle. Os resultados em dot plot mostram marcação por fosfatidilserina associada e não associada à marcação com iodeto de propídio bem evidente com 48 horas de infecção (figura 13). Observa-se aumento de marcação somente com anexina V nos tempos 48 e 72 horas (tabela 3).

Figura 13. Detecção de apoptose pelo método da Anexina V em células esplênicas não-aderentes ex-vivo. 10^6 células esplênicas de hamsteres dos tempos de infecção de 20, 48, 72 horas, 7 e 30 dias e animais controle foram marcadas para anexina V com FITC e com iodeto de propídio.e feita leitura de 10.000 eventos em citometria de fluxo e análise em janela de células não aderentes em Cell Quest. Dot plot representando a análise de um animal por grupo. Resultados expressos em porcentagem.

Tabela 3. Detecção de morte em células esplênicas não-aderentes ex-vivo. Hamsteres infectados e controle. Resultados expressos em média de porcentagem e desvio padrão.

Tempos de Infecção	ANEX (-) PI (+)	ANEX (+) PI (-)	ANEX(+) e PI(+)	ANEX(+)
controle (n=1)	3,64	2,06	0,27	2,33
20 horas (n=4)	9,38 ± 2,25	43,42 ± 8,90	5,22 ± 3,0	48,64 ± 11,34
48 horas (n=4)	10,87 ± 3,63	54,46 ± 7,68	3,11 ± 1,16	57,57 ± 6,53
72 horas (n=5)	7,06 ± 2,52	40,39 ± 19,61	2,80 ± 1,68	43,18 ± 19,70
7 dias (n=1)	4,52	4,75	0,71	5,46
30 dias (n=1)	1,89	0,76	0,12	0,88

Deteccção da caspase 3 clivada

Foi avaliada a clivagem da caspase 3 em tempos precoces (20, 48, 72 horas), intermediário (7 dias) e tardio (30 dias) de infecção, em células esplênicas não aderentes. Como controle a presença da clivagem de caspase 3 também foi avaliada em animal limpo. Nos tempos mais precoces de infecção (20 e 48 horas) há uma grande porcentagem de eventos positivos para caspase 3 clivada, posteriormente ocorre uma diminuição progressiva desta marcação, com quase ausência de marcação no tempo de 30 dias de infecção (figura 14).

Figura 14. Deteccção de caspase 3 clivada em células ex-vivo. 10^6 células esplênicas de hamsteres com tempos de infecção de 20, 48, 72 horas, 7 e 30 dias; e animal controle foram marcadas com anticorpo anti-caspase 3 clivada conjugada com fluorescência alexa flor e analisados 10.000 eventos em janela de células não aderentes por citometria de fluxo pelo programa Cell Quest. Histograma expressando porcentagem de fluorescência em um animal para cada tempo de infecção e animal controle.

4.5.2 Em células esplênicas estimuladas

Deteccção da fragmentação de DNA (método do TUNEL)

Em células esplênicas não aderentes estimuladas com ConA e Ag de LLC, foram detectadas baixa marcação para fragmentação do DNA, nos tempos de 6, 20, 48, 72 horas e 7 dias de infecção. Nos tempos de 6 e 20 horas de infecção estimulados com antígeno de LLC, embora baixa a marcação, a percentagem encontrada é maior quando comparada à concanavalina A e ao controle (figura 15). Entretanto com 60 dias de infecção a marcação em células estimuladas com antígeno de *Leishmania* é destacada (figura 15).

Figura 15. Detecção de apoptose em células esplênicas estimuladas pelo método TUNEL. 2×10^7 células esplênicas foram estimuladas com ConA e Ag de *Leishmania* por 24 horas e marcadas para detecção de fragmentação de DNA pelo método do TUNEL. Foram lidos 10.000 eventos por citometria de fluxo pelo programa Cell Quest e feita análise na janela de células não aderentes. Histograma expressando resultados em porcentagem de um animal para cada tempo de infecção.

Deteccção da exposição de fosfatidilserina

Foi detectada a exposição de fosfatidilserina da membrana celular através da ligação à anexina V-FITC juntamente com marcação do iodeto de propídio, em células esplênicas sob estímulos de concanavalina A e Ag de LLC. Na análise da janela de células esplênicas não aderentes observamos marcação de anexina V no início da infecção (6 horas) seguida de queda de marcação para apoptose, tanto em células estimuladas com mitógeno como com antígeno de LLC (figura 16). Com 48 horas de infecção há um aumento da marcação da exposição de fosfatidilserina, seguida de queda da marcação (tabela 4) em ambos os estímulos utilizados. Entretanto, com 7 dias de infecção há um aumento da marcação por anexina V somente em células estimuladas com antígeno de *Leishmania* (figura 16). Aos 15 e 30 dias de infecção não há marcação de apoptose independente do estímulo utilizado, porém na fase tardia de infecção (60 dias) há um aumento evidente da marcação por anexina V tanto em células estimuladas com mitógeno como por antígeno de LLC (figura 16).

Nos tempos iniciais (6 e 48 horas), intermediário (7 dias) e tardio (60 dias) de infecção a apoptose ocorre em tempo precoce de morte, independente do estímulo; detectada por marcação de anexina V sem co-marcação com iodeto de propídio; (figura 17). Em todos os tempos de infecção analisados não há marcação evidente somente com iodeto de propídio seja em células incubadas com concanavalina A ou com Ag de LLC (tabela 4).

Figura 16. Detecção de morte em células esplênicas estimuladas. 2×10^7 células esplênicas foram estimuladas com ConA e Ag de *Leishmania* por 24 horas e marcadas para detecção da exposição de fosfatidilserina pelo método de anexina V. Foram lidos 10.000 eventos por citometria de fluxo pelo programa Cell Quest e feita análise na janela de células não aderentes. Dot plot expressando resultados em porcentagem de um animal para cada tempo de infecção.

Tabela 4. Detecção de morte em células esplênicas não-aderentes estimuladas com concanavalina A e antígeno de *Leishmania* de animais infectados e controle não infectados. Resultados expressos em média de porcentagem e desvio padrão. **A.** sem estímulo, **B.** estimulado com concanavalina A e **C.** estimulado com antígeno de *Leishmania*.

A

Tempos de Infecção	ANEX (-) e PI (+)	ANEX (+) e PI (-)	ANEX(+) e PI(+)	ANEX(+)
controle (n=4)	2,12 ± 2,71	0,73 ± 0,83	0,02 ± 0,03	0,75 ± 0,82
6 horas (n=2)	0,48 ± 0,04	2,58 ± 1,03	0,03 ± 0,04	2,60 ± 0,99
20 horas (n=3)	1,30 ± 1,61	2,90 ± 4,42	0,22 ± 0,38	3,12 ± 4,80
48 horas (n=3)	1,08 ± 0,83	7,57 ± 3,08	0,17 ± 0,14	7,73 ± 2,96
72 horas (n=3)	0,70 ± 0,77	0,76 ± 0,82	0,10 ± 0,16	0,86 ± 0,98
7 dias (n=3)	0,86 ± 0,77	2,69 ± 3,18	0,04 ± 0,03	2,73 ± 3,21
15 dias (n=3)	0,39 ± 0,03	0,39 ± 0,03	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,03
30 dias (n=3)	0,90 ± 0,75	1,56 ± 1,98	0,02 ± 0,01	1,58 ± 1,98
60 dias (n=6)	2,07 ± 1,12	24,29 ± 7,99	0,51 ± 0,44	24,80 ± 8,42

B

Tempos de Infecção	ANEX (-) e PI (+)	ANEX (+) e PI (-)	ANEX(+) e PI(+)	ANEX(+)
controle (n=4)	1,00 ± 0,91	5,18 ± 4,67	0,22 ± 0,18	5,40 ± 4,84
6 horas (n=2)	0,72 ± 0,51	9,08 ± 5,25	0,15 ± 0,21	9,22 ± 5,46
20 horas (n=3)	0,40 ± 0,06	0,45 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,45 ± 0,03
48 horas (n=3)	0,97 ± 0,60	3,92 ± 2,50	0,08 ± 0,05	4,00 ± 2,47
72 horas (n=3)	0,87 ± 0,93	0,70 ± 0,73	0,07 ± 0,10	0,78 ± 0,83
7 dias (n=3)	1,11 ± 1,14	3,18 ± 3,08	0,013 ± 0,17	3,30 ± 3,10
15 dias (n=3)	0,35 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,37 ± 0,02
30 dias (n=3)	0,85 ± 0,66	4,81 ± 7,68	0,07 ± 0,12	4,88 ± 7,80
60 dias (n=6)	2,70 ± 1,06	26,61 ± 6,75	0,48 ± 0,34	27,10 ± 7,08

C

Tempos de Infecção	ANEX (-) e PI (+)	ANEX (+) e PI (-)	ANEX(+) e PI(+)	ANEX(+)
controle (n=4)	0,79 ± 0,62	5,98 ± 4,10	0,22 ± 0,17	6,19 ± 4,84
6 horas (n=2)	0,62 ± 0,32	8,15 ± 5,07	0,26 ± 0,29	8,40 ± 5,36
20 horas (n=3)	0,95 ± 0,96	3,28 ± 4,97	0,48 ± 0,83	3,76 ± 5,80
48 horas (n=3)	0,86 ± 0,82	10,85 ± 15,20	0,20 ± 0,21	11,05 ± 15,21
72 horas (n=3)	0,90 ± 0,79	4,68 ± 4,14	0,19 ± 0,23	4,87 ± 4,22
7 dias (n=3)	0,84 ± 0,72	6,43 ± 5,67	0,72 ± 1,15	7,15 ± 6,60
15 dias (n=3)	0,36 ± 0,03	0,39 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,39 ± 0,05
30 dias (n=3)	1,06 ± 0,81	1,63 ± 2,27	0,05 ± 0,06	1,67 ± 2,33
60 dias (n=6)	2,02 ± 0,65	30,92 ± 5,43	0,49 ± 0,20	31,41 ± 5,41

Figura 17. Fase inicial e tardia de apoptose em células esplênicas estimuladas. 2×10^7 células esplênicas foram estimuladas com ConA (**B**) e Ag de *Leishmania* (**C**) por 24 horas e marcadas para detecção da exposição de fosfatidilserina pelo método de anexina V e iodeto de propídio. Células incubadas com meio de cultura foram utilizadas como controle (**A**). Foram lidos 10.000 eventos por citometria de fluxo pelo programa Cell Quest e feita análise na janela de células não aderentes. Gráfico comparativo entre a marcação positiva para anexina V/negativa para iodeto de propídio (fase inicial de apoptose) e positiva tanto para anexina V como para iodeto de propídio (fase mais tardia de apoptose). Resultados expressos em média de porcentagem de eventos marcados.

Deteção da caspase 3 clivada

Células esplênicas estimuladas com concanavalina A e antígeno de *Leishmania* dos tempos de infecção de 48, 72 horas e 7 dias de infecção e animal controle foram avaliadas para marcação de caspase 3 clivada. Em todos os tempos de infecção não foi observado marcação evidente da caspase 3 clivada, independente do estímulo utilizado (figura 18).

Figura 18. Detecção de caspase 3 clivada por citometria de fluxo em células esplênicas estimuladas. 2×10^7 células esplênicas de hamsteres infectados foram estimuladas com concanavalina A e antígeno de LLC; posteriormente marcadas anticorpo anti-caspase 3 clivada e lidos 10.000 eventos por citometria de fluxo no programa Cell Quest e feita análise em janela de células não aderentes. Histograma expressando resultados em porcentagem de fluorescência de um animal para cada tempo de infecção e controle não estimulado.

4.5.3 Correlação dos resultados de apoptose

Nos períodos precoces de infecção (20 e 48 horas), em células esplênicas ex-vivo, a caspase 3 clivada esta marcada em mais de 70% dos eventos analisados. Com 72 horas de infecção esta marcação aproxima-se de 10% dos eventos, chegando nula aos 30 dias de infecção. Assim como na marcação de caspase 3 clivada, a exposição de fosfatidilserina é maior em períodos mais precoces de infecção, com posterior declínio de sua marcação por anexina V. A marcação do DNA fragmentado pelo

método TUNEL apresenta-se baixa nos tempos de infecção analisados (iniciais), com leve aumento com 48 horas de infecção (figura 19).

Figura 19. Apoptose de células esplênicas ex-vivos. Correlação dos resultados de apoptose de células esplênicas de hamsteres em tempos iniciais, intermediários e tardios de infecção. Apoptose avaliada através da quebra do DNA, da exposição de fosfatidilserina associada à ligação do iodeto de propídio ao DNA fragmentado; e da detecção de caspase 3 clivada. 10.000 eventos lidos em citometria de fluxo e análise em janela de células não aderentes. Resultados expressos em media da porcentagem de eventos marcados.

Observa-se baixa marcação para apoptose em células esplênicas estimuladas, tanto pela detecção da fragmentação de DNA, para exposição de fosfatidilserina ou clivagem da caspase 3, não chegando a 35% dos eventos (figura 20). A marcação de caspase 3 clivada é praticamente nula em todos os tempos de infecção analisados, em células estimuladas com concanavalina A ou com Ag de LLC (figura 20). A marcação pelo método TUNEL se comporta diferente frente aos estímulos. Frente à concanavalina A a marcação por TUNEL acompanha a marcação de anexina V em

tempos mais precoces da infecção: ambas as marcações apresentam-se altas com 6 horas de infecção decaindo com 20 horas; e com 48 horas há um aumento de ambas as marcações. Já com 72 horas de infecção a diminuição da marcação por anexina V é maior quando comparada à diminuição da marcação pelo TUNEL, chegando a quase nula. A marcação pelo método TUNEL continua diminuindo até aos 60 dias de infecção. Já a marcação por anexina V oscila, havendo um leve aumento da marcação com 7 dias de infecção, seguido de diminuição aos 15 dias e posterior aumento evidente até 60 dias de infecção (figura 20B).

Já as marcações de TUNEL e anexina V em células esplênicas não-aderentes, estimuladas com antígeno de *Leishmania* parecem seguir padrões opostos em tempos iniciais de infecção (6, 20, 48 e 72 horas) (figura 20C). A partir de 7 dias de infecção, a marcação por TUNEL aumenta de 3,21% para 20,51% dos eventos. Em contrapartida a marcação por anexina V cai de 7 dias aos 15 dias de infecção. Já aos 60 dias de infecção a marcação por anexina V chega a percentagem maior quando comparada à marcação pelo método TUNEL (31,41% dos eventos) (figura 20C).

Figura 20. Apoptose de células esplênicas estimuladas. Correlação dos resultados de apoptose de células esplênicas estimuladas com concanavalina A (**B**) ou com antígeno de *Leishmania* (**C**). Células incubadas com meio de cultura foram utilizadas como controle (**A**). Apoptose avaliada através da quebra do DNA, da exposição de fosfatidilserina associada à ligação do iodeto de propídio ao DNA fragmentado; e da detecção de caspase 3 clivada. 10.000 eventos lidos em citometria de fluxo e análise em janela de células não aderentes. Resultados expressos em meda da porcentagem de eventos marcados.

DISCUSSÃO

5 Discussão

O hamster é considerado um bom modelo experimental para o estudo de um grande número de processos infecciosos que causam doença no homem, tais como sífilis, micobacteriose, arbovirose (Frenkel e Caldwell⁸⁸), doença de Chagas (Bilate et al.⁸⁹) e leishmaniose visceral (Melleney²¹). Hamsteres infectados com *Leishmania (L.) chagasi* desenvolvem LV, plenamente manifesta, cursando com hepatoesplenomegalia, perda de peso, ascite e alterações laboratoriais tais como hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia e pancitopenia (Melleney²¹, Stauber²², Bunn-Moreno et al.²³ e Campos-Neto e Bunn-Moreno⁹⁰), sendo estas características clínicas similares às que ocorrem no homem, com doença ativa. Desta forma, o hamster infectado com *Leishmania (L.) chagasi* é um bom modelo para estudo de imunossupressão na LV (Goto e Lindoso²⁰).

Algumas limitações são encontradas na utilização deste modelo experimental na leishmaniose visceral devido a não disponibilidade de marcadores específicos para moléculas que possibilitem a avaliação de resposta imune celular e humoral (Espitia et al.⁹¹), entretanto Melby et al.⁵¹ clonaram e sequenciaram DNA complementar de algumas citocinas de hamsteres o que vem trazendo grandes avanços no estudo de expressão de citocinas por northern blotting, PCR semi-quantitativo e PCR real time (Melby et al.³⁷, Travi et al.⁹², Rama Iniguez et al.⁹³ e Espitia et al.⁹¹). Já o camundongo, apesar de haver disponibilidade de marcadores para praticamente todas as suas moléculas, este animal quando infectado com *Leishmania* não é um bom modelo para estudo da dinâmica da imunossupressão na LV, pois mesmo as linhagens susceptíveis controlam a infecção após 8 semanas de

infecção (Barbosa Júnior et al.¹⁷, Murray e Hariprashad¹⁸, Engewerda et al.¹⁹ e Goto e Lindoso²⁰), sendo este um excelente modelo para estudo de imunidade (Goto e Lindoso²⁰).

Neste trabalho utilizamos hamsters infectados intraperitonealmente com *Leishmania (L.) chagasi* para avaliar parâmetros de resposta imunológica celular. Inicialmente observamos aumento progressivo tempo dependente da carga parasitária no baço. Estudo anterior de nosso grupo observou aumento da carga parasitaria também em fígado, acompanhado de hepatoesplenomegalia, ascite, perda de peso do animal e óbito após 90 dias de infecção (Lindoso²⁵). Os nossos dados ratificam que hamster infectado com *Leishmania chagasi* é ideal para estudos da imunossupressão que ocorre durante o estabelecimento e desenvolvimento da LV (Goto e Lindoso²⁰).

Uma das principais conseqüências imunológicas na LV plenamente manifesta é a imunossupressão observada tanto em humanos como em animais, sendo a resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico, esplênicas ou de linfonodos, frente a antígenos específicos ou a mitógenos (principalmente concanavalina A e fitohemaglutinina) amplamente utilizada para avaliar a resposta celular. Sendo assim, avaliando a dinâmica da instalação da imunossupressão em tempos iniciais (6, 20, 48 e 72 horas), intermediários (7 e 15 dias) e tardios (30 dias) de infecção observamos resposta preservada frente à ConA, em todos os tempos de infecção. Porém a cinética da resposta frente ao Ag bruto de LLC apresentou-se diferente, com resposta proliferativa nos tempos precoces de infecção (48 e 72 horas) e posterior ausência da resposta nos outros tempos. Neste trabalho foi a primeira vez que a dinâmica da instalação da imunossupressão na LV experimental foi demonstrada em tempos bem iniciais da infecção.

Anteriormente neste modelo experimental, nosso grupo mostrou imunossupressão antígeno dependente em tempos intermediários (15 e 30 dias) e tardios (60 e 90 dias) de infecção (Lindoso²⁵). Entretanto, são encontradas divergências nos resultados de resposta proliferativa frente a mitógenos e a antígeno de *Leishmania* em hamsteres com LV experimental. Nickol e Bonventre¹⁵ observaram resposta proliferativa frente a antígeno de *Leishmania* e a ConA até seis semanas de infecção e ausência de resposta aos dois estímulos após oito semanas de infecção. As divergências deste estudo com o nosso podem ser atribuídas à diferença de via de inoculação, bem como a espécie do parasito, uma vez que utilizamos a via intraperitonal e *Leishmania (L.) chagasi*.

Gifawesen e Farrel²⁴ confirmaram a influencia da via de inoculação do parasito no desenvolvimento da doença, pois observaram resposta proliferativa diferentes entre células mononucleares de sangue periférico, células esplênicas e células de linfonodos frente a concanavalina A e a Ag de *Leishmania* quando hamsteres foram infectados com *Leishmania (Leishmania) donovani* por via intracardíaca ou intradérmica. Enquanto nos animais infectados por via intracardíaca os resultados foram similares aos apresentados por Nickol e Bonventre¹⁵, em hamsteres infectados por via intradérmica, esses autores observaram resposta proliferativa de células esplênicas preservada frente à concanavalina A em todos os tempos de infecção e resposta a antígeno de *Leishmania* preservada até a sexta semana de infecção. A resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico e de linfonodo foi similar ao das células esplênicas.

Em outros estudos de avaliação de resposta proliferativa em hamster infectado por via intracardíaca com *Leishmania (L.) donovani*, alguns resultados são

semelhantes aos nossos, como preservação da resposta frente a ConA em todos os tempos de infecção (Bunn-Moreno et al.²³ e Rodrigues Jr et al.²⁶). Entretanto também observaram resposta proliferativa suprimida frente ao antígeno de *Leishmania* (Rodrigues Jr et al.²⁶ e Vasconcelos et al.²⁸), diferindo de nossos resultados. Isto se deve provavelmente ao fato destes estudos não ter avaliado a doença em tempos semelhantes aos nossos, em fase mais inicial da infecção (20, 48 e 72 horas de infecção).

A anergia de linfócitos T a antígeno específico tanto em humanos como em modelo experimental ocorre durante a doença em atividade, havendo recuperação da resposta proliferativa após sucesso terapêutico (Carvalho et al.¹⁴, Nickol e Bonventre¹⁵). O mecanismo pelo qual ocorre essa anergia a antígeno de *Leishmania* não está bem claro. Vários fatores são descritos como responsáveis pela imunossupressão na LV, tais como presença de células aderentes (Carvalho et al.⁹⁴ e Basak et al.²⁷), fator sérico supressor (Vasconcelos et al.²⁸ e Barral et al.²⁹), receptor solúvel de IL-2 (Barral-Netto et al.³⁰), defeito nas células apresentadoras de antígeno (Reiner et al.³¹ e Rodrigues Jr et al.²⁶), TGF- β (Rodrigues Jr et al.³² e Barral-Netto et al.³³) que estaria inibindo a atividade do macrófago (Kehrl et al.³⁴ e Ding et al.³⁵), participação de moléculas co-estimulatórias (B7-1 ou B7-2) (Saha et al.³⁶), e ainda diminuição da produção de óxido nítrico (NO) (Melby et al.³⁷, Martins et al.³⁸ e Dasgupta et al.³⁹).

Dentre esses vários fatores descritos como responsáveis pela imunossupressão na leishmaniose visceral, destaca-se o perfil de citocinas Th1 e Th2 estudado principalmente em modelo experimental de camundongo, que se comportam como susceptíveis ou resistentes à doença. Em camundongos infectados

por *Leishmania major* a proteção da leishmaniose tegumentar parece estar relacionada à produção de citocinas do tipo Th1, como IFN- γ e TNF- α , estimuladas pela apresentação de antígeno juntamente com IL-12 (Goto e Prianti⁹⁵). Já a susceptibilidade da doença é atribuída à resposta imune do tipo Th2 com produção principalmente de IL-4 e IL-13 (Sacks e Noben-Trauth⁹⁶ e Goto e Prianti⁹⁵). Porém na LV em camundongos infectados por *Leishmania donovani*, tanto células CD4+ como CD8+ parecem ter importância na resistência da leishmaniose, e estão envolvidas na produção de IL-2, IL-12 e IFN- γ (Goto e Prianti⁹⁵). Em animais susceptíveis ocorre a produção de IL-10, sem envolvimento de IL-4, e células B (Goto e Lindoso²⁰ e Goto e Prianti⁹⁵).

Neste estudo, não observamos uma dicotomia evidente entre perfil Th1 ou Th2 de citocinas produzidas pelas células esplênicas, característica similar ao ocorrido no homem. Nossos resultados mostram RNA mensageiro de IL-2, IL-4, INF- γ , TNF- α e TGF- β tanto em células estimuladas com mitógeno e antígeno bruto de *Leishmania (L.) chagasi* assim como em células ex-vivo. Melby et al.⁵¹ e Lindoso²⁵ também estudaram o perfil de RNA mensageiro em hamsteres com LV e obtiveram resultados semelhantes aos nossos.

Em nossos resultados, a presença de banda forte somente em TGF- β sem associação a IL-10 como observado por Melby et al.⁵¹, presente em todos os tempos de infecção e nos animais não infectados pode estar relacionado ao mecanismo de escape de *Leishmania* à resposta imune celular. Em hamsteres infectados com *Leishmania*, Rodrigues-Jr et al.³² observaram aumento da produção de TGF- β , por imunohistoquímica, em baço de hamsteres em tempos mais tardios de infecção, quando comparados a tempos iniciais e animais controle. Barral-Netto et al.⁹⁷

encontraram que TGF- β é utilizado como fator de proliferação de *Leishmania* em cultura e concluíram que esta citocina seria responsável pelo escape do parasito da resposta imune. Os nossos achados de banda forte de TGF- β sugerem que esta citocina possa ser um fator importante de imunossupressão em hamster, visto que este animal é modelo ideal para estudo de patogenia e imunossupressão, de diversos patógenos. Uma vez que observamos presença da forte banda de TGF- β também em animais controles não infectados, hipotetizamos assim que este animal é naturalmente susceptível ao desenvolvimento de leishmaniose visceral.

Outras citocinas também parecem modular a resposta imune na leishmaniose visceral, como TNF- α e IL-4 que participam da produção de óxido nítrico de forma positiva e negativa, respectivamente (Liew et al.⁶³, Silva et al.⁹⁸, Cunha et al.⁵⁶ e Taylor-Robinson et al.⁵⁷). Nossos resultados mostram claramente banda forte de TNF- α nos vários tempos de infecção quando as células foram estimuladas com concanavalina A ou antígeno de *Leishmania*, assim como banda de IL-4, o que pode estar contribuindo com a imunossupressão neste modelo experimental.

Avaliando a produção de óxido nítrico observamos inicialmente baixa concentração de nitrito em todos os tempos de infecção, no entanto quando as células foram estimuladas com antígeno de *Leishmania* observamos níveis menores ainda nos tempos de 48 e 72 horas de infecção, período em que há proliferação celular frente ao antígeno. Melby et al.³⁷ avaliando o óxido nítrico em tecido esplênico de hamster observou presença de níveis baixos de iNOS, tanto em animal infectado por *Leishmania donovani* como em animal não-infectado. Entretanto Dasgupta et al.³⁹ observaram altos níveis de nitrito (método de Griess⁸⁷) em células esplênicas de hamsteres infectados com *Leishmania donovani*, incubadas por 60 horas com

mitógeno. Acreditamos que os baixos níveis encontrados por nosso grupo sejam devido ao pouco tempo de incubação (24 horas) uma vez que o óxido nítrico sintetizado a partir de iNOS requer algumas horas para ser expresso e sua produção continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados (Dusting e MacDonald⁹⁹ e Dusse et al.⁵⁸).

Estudos em humanos e em modelos experimentais mostram a falha da imunidade celular relacionada ao óxido nítrico, como na malária (Ahvazi et al.¹⁰⁰) e em tripanossomatídeos (Schleifer e Mansfield¹⁰¹ e Abrahamsohn e Coffman¹⁰²). Em pacientes infectados por *Plasmodium* o aumento da produção de óxido nítrico está relacionado à proliferação reduzida de linfócitos (Bohlke⁵⁹). O mesmo mecanismo é observado em hamsters infectados por *Leishmania donovani*, no qual a capacidade de células esplênicas não-aderentes (macrófagos) produzirem NO é associada à inibição da resposta proliferativa frente à concanavalina A (Dasgupta et al.³⁹). Já em doença de Chagas, a imunossupressão é relacionada com a produção de IFN- γ e TNF- α (produzidos pelos macrófagos), os quais induziriam a apoptose de células T durante a fase aguda da doença (Martins et al.³⁸)

A morte celular por apoptose é descrita em várias infecções influenciando o seu desenvolvimento (Ameisen et al.⁷³, Groux et al.⁷⁴, Roger et al.⁷⁵, Hu et al.⁷⁹, Khan et al.⁸⁰, Lopes et al.⁸¹, Toure-Balde et al.⁷⁷ e Balde et al.⁷⁸). Em leishmaniose, a apoptose é descrita como fator que pode participar da imunopatogenia da doença. Em camundongos com LV há aumento de apoptose de células TCD4+ que poderiam contribuir para a imunossupressão e desenvolvimento da doença (Das et al.⁸⁵).

Em hamsters observamos presença de apoptose, mais especificamente definida pelo aumento de caspase 3 clivada, em células esplênicas não aderentes ex-

vivo principalmente nos tempos iniciais de infecção (20 e 48 horas). Já em células esplênicas estimuladas com concanavalina A e com antígeno de *Leishmania*, também nos tempos iniciais, a marcação para apoptose varia de acordo com a técnica utilizada (anexina V e TUNEL), não seguindo um padrão de marcação. Esta variação entre os tipos de marcação pode ser devido à fase da morte celular em que a célula está no momento em que é marcada. É sabido que a técnica de detecção da exposição de fosfatilserina principalmente quando não marcada juntamente com iodeto de propídio, como observado em nossos resultados, indica uma morte celular em fase mais inicial quando comparada à detecção da fragmentação de DNA.

No decorrer da infecção, a apoptose em células esplênicas ex-vivo não-aderentes diminui chegando a quase nula. Já nas células esplênicas não-aderentes estimuladas ocorre um aumento da marcação por anexina V independente do estímulo. A detecção da fragmentação do DNA em células não-aderentes incubadas com concanavalina A sofre diminuição, sendo praticamente nula aos 60 dias de infecção; entretanto o oposto ocorre nas células não-aderentes quando estimuladas com antígeno de *Leishmania*. Diante destes resultados acreditamos que esteja ocorrendo morte de células esplênicas não-aderentes (linfócitos) antígeno reativas. A marcação presente em células ex-vivo foi maior quando comparada às células estimuladas devido à baixa ativação das mesmas, uma vez que a maioria das células ativadas ocorreu apoptose no primeiro contato com a infecção. No desenvolvimento da infecção há baixa ativação de células esplênicas não-aderentes, confirmado pela presença de imunossupressão antígeno dependente instalada após sete dias de infecção e refletido pela baixa marcação para apoptose em células ex-vivo. Diante deste perfil, as células esplênicas estimuladas com antígeno de LLC são ativadas e

conseqüentemente morrem por apoptose. Anteriormente, neste modelo de hamsteres com leishmaniose visceral, Lindoso²⁵ observou principalmente nos tempos iniciais de infecção, apoptose de células não aderentes (linfócitos) provavelmente induzida por ativação, quando estimuladas in vitro com antígeno ou mitógeno. Fenômeno semelhante foi observado em modelo de doença de Chagas experimental em camundongo onde células esplênicas, principalmente TCD4⁺, estimuladas com anticorpo anti-CD3 e concanavalina A entraram em apoptose (Lopes et al.⁸¹). Os achados de Das et al.⁸⁵ também demonstram apoptose induzida por ativação em células T CD4⁺ produtoras de citocinas tipo Th1, quando estimuladas com anti-CD3; assim como Alexander et al.¹⁰³ em modelo de camundongos infectados com *Leishmania (L.) donovani*.

Entretanto, apesar da presença de marcações de apoptose em células antígeno reativas caracterizando a imunossupressão antígeno dependente presente em nosso estudo, células esplênicas não-aderentes estimuladas obtiveram porcentagem baixas de marcação, principalmente quando marcadas para caspase 3 clivada. Provavelmente devido à intensa proliferação das células em cultura, a quantidade de células utilizada na marcação de apoptose foi maior do que a recomendada pelo fabricante do kit.

Nossos resultados mostram pela primeira vez, em hamsteres infectados intraperitonealmente com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, a instalação da imunossupressão com 20, 48 e 72 horas caracterizado por resposta imune, diminuição da produção de óxido nítrico e produção TGB-β, IFN-γ e IL-4, podendo influenciar no aumento da replicação do parasita no macrófago, e concomitantemente proliferação e apoptose de linfócitos. No desenvolvimento da infecção, a partir de 7 a

60 dias, a LV instalada é caracterizada por imunossupressão antígeno dependente com diminuição da apoptose de células T antígeno-reativas e aumento da produção de óxido nítrico. Os mecanismos de relação do óxido nítrico e de citocinas no processo de imunossupressão ainda devem ser bastante estudados, sendo ideal a possibilidade de relação com a população de linfócitos, porém pelo modelo experimental atualmente este estudo é bem restrito.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

- Há aumento progressivo da carga parasitária em baço de hamsteres infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi*, sendo este um bom modelo para o estudo da leishmaniose visceral.
- Em tempos iniciais de infecção, 48 e 72 horas, há o início da resposta imune celular, pois se observa resposta proliferativa significativa em células esplênicas estimuladas com antígeno de *Leishmania* nestes tempos.
- A imunossupressão instala-se a partir de 7 dias de infecção e é antígeno dependente, pois foi observada resposta proliferativa preservada nas células esplênicas estimuladas com concanavalina A e ausência de resposta em células estimuladas com antígeno de *Leishmania*.
- As citocinas produzidas por células esplênicas não obedece a um padrão de dicotomização Th1, Th2, visto que observamos produção de citocinas de ambos os perfis em células ex-vivo e em células estimuladas, tanto com concanavalina A e como com antígeno de *Leishmania*.
- Citocinas TGF- β , IFN- γ parecem influenciar na proliferação celular e na produção de óxido nítrico, pois em toda a cinética da doença são observadas bandas fortes destas citocinas.
- A produção de óxido nítrico em células esplênicas, medida pela dosagem de nitrito, pode estar relacionada à instalação da leishmaniose visceral. No início da infecção, 20 horas, sua produção parece estar relacionada à apoptose de células esplênicas não-aderentes. Já com 48 e 72 horas de infecção a produção diminuída de óxido nítrico parece influenciar na replicação do

parasito dentro do macrófago. No decorrer da infecção a produção de óxido nítrico parece ser balanceada para que não ocorra morte dos parasitos e induza imunossupressão através da morte por apoptose.

- A imunossupressão antígeno dependente é decorrente de apoptose de células esplênicas não-aderentes, observado principalmente pela marcação de caspase-3 clivada em células ex-vivo nos tempos iniciais da infecção. Há também detecção da exposição de fosfatidilserina e da quebra de DNA em células esplênicas estimuladas com antígeno de *Leishmania* com a progressão da doença, principallmente nos tempos tardios.

Tomados juntos, nossos dados mostram um aumento progressivo da infecção por LLC em hamsteres, cuja instalação da doença ocorra em tempos iniciais (20, 48, 72 horas), caracterizada por inicio da resposta celular e apoptose de células esplênicas mononucleares. A doença apresenta-se instalada aos 7 dias de infecção caracterizada por imunossupressão antígeno dependente. Provavelmente esta imunossupressão ocorre por morte de células esplênicas antígeno-reativas via apoptose, influenciado pela produção de citocina IFN- γ e IL-4 que regulam a produção de óxido nítrico em concentrações que não interfiram na replicação do parasito dentro dos macrófagos. As citocinas produzidas parecem não seguir um padrão Th1 ou Th2 relacionados à susceptibilidade e resistência à doença.

Referências

7 Referencias

1. Clem A. A current perspective on leishmaniasis. J Glob Infect Dis 2010 May;2(2):124-6.
2. WHO. Leishmaniasis magnitude of the problem[cited in 2010]: Available from: <http://www.nc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-5/cutaneous-leishmaniasis.aspx>.
3. MS. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regioes e Unidades Federadas 1990 a 2009 [citado 2010].
4. CVE. Leishmaniose Visceral Americana Humana: casos autoctones e óbitos de LVA, no Estado de Sao Paulo, 1999 a 2010. 2010.
5. Peters W, Killick-Kendrick. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press Inc; 1987. p. 1-120.
6. Lainson R, Shaw JJ. A brief history of the genus Leishmania (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. J BrazAssoc Advanc Sci 1992;44:2-3.
7. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin Infect Dis 1997 Apr;24(4):684-703.
8. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G, Jr. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. Parasitol Today 2000 Apr;16(4):142-4.
9. Warburg A, Saraiva E, Lanzaro GC, Titus RG, Neva F. Saliva of Lutzomyia longipalpis sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1994 Jul 29;345(1312):223-30.
10. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. Exp Mol Pathol 2002 Apr;72(2):132-41.
11. Mosser DM, Rosenthal LA. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. Semin Cell Biol 1993 Oct;4(5):315-22.

12. Warren KS. Leishmaniasis. Immunology and molecular biology of parasitic infections. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications; 1993. p. 237-68.
13. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, et al. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1986 Dec;154(6):1003-11.
14. Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD, Jr. Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. Infect Immun 1981 Aug;33(2):498-500.
15. Nickol AD, Bonventre PF. Immunosuppression associated with visceral leishmaniasis of hamsters. Parasite Immunol 1985 Jul;7(4):439-49.
16. Ghose AC, Haldar JP, Pal SC, Mishra BP, Mishra KK. Phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation test in Indian kala-azar. Trans R Soc Trop Med Hyg 1979;73(6):725-6.
17. Barbosa Junior AA, Andrade ZA, Reed SG. The pathology of experimental visceral leishmaniasis in resistant and susceptible lines of inbred mice. Braz J Med Biol Res 1987;20(1):63-72.
18. Murray HW, Hariprashad J. Interleukin 12 is effective treatment for an established systemic intracellular infection: experimental visceral leishmaniasis. J Exp Med 1995 Jan 1;181(1):387-91.
19. Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SE, Smelt SC, Kaye PM. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. Eur J Immunol 1998 Feb;28(2):669-80.
20. Goto H, Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. Braz J Med Biol Res 2004 Apr;37(4):615-23.
21. Meleney HE. The Histopathology of Kala-Azar in the Hamster, Monkey, and Man. Am J Pathol 1925 Mar;1(2):147-68 11.
22. Stauber L. Host resistance to the Khartoum strain of *Leishmania donovani*. Rice Inst Pamph 1958;45:80-96.
23. Bunn-Moreno MM, Madeira ED, Miller K, Menezes JA, Campos-Neto A. Hypergammaglobulinaemia in *Leishmania donovani* infected hamsters: possible association with a polyclonal activator of B cells and with suppression of T cell function. Clin Exp Immunol 1985 Feb;59(2):427-34.

24. Gifawesen C, Farrell JP. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. *Infect Immun* 1989 Oct;57(10):3091-6.
25. Lindoso AL. Apoptose na evolucao da leishmaniose visceral experimental em hamsteres. Sao Paulo: Universidade de Sao Paulo; 2002.
26. Rodrigues Junior V, JS S, A C-N. Selective inability of spleen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediated specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasited Immunol* 1992;14:49-58.
27. Basak SK, Saha B, Bhattacharya A, Roy S. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. II. Adherent cell-mediated down-regulation of delayed-type hypersensitivity response and up-regulation of B cell activation. *Eur J Immunol* 1992 Aug;22(8):2041-5.
28. Vasconcellos RC, Urago KP, Bunn-Moreno MM, Madeira ED. Suppressor activity in *Leishmania donovani*-infected hamster serum: reversion by delipidated bovine serum albumin and role in cell cycle events. *Braz J Med Biol Res* 1996 May;29(5):615-22.
29. Barral A, Carvalho EM, Badaro R, Barral-Netto M. Suppression of lymphocyte proliferative responses by sera from patients with American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 1986 Jul;35(4):735-42.
30. Barral-Netto M, Barral A, Santos SB, Carvalho EM, Badaro R, Rocha H, et al. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1991 Jul 1;147(1):281-4.
31. Reiner NE, Ng W, McMaster WR. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* 1987 Mar 15;138(6):1926-32.
32. Rodrigues Junior V, Santana da Silva J, Campos-Neto A. Transforming growth factor beta and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 1998 Mar;66(3):1233-6.
33. Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993 Apr 15;90(8):3442-6.

34. Kehrl JH, Wakefield LM, Roberts AB, Jakowlew S, Alvarez-Mon M, Derynck R, et al. Production of transforming growth factor beta by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J Exp Med* 1986 May 1;163(5):1037-50.
35. Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srinivasan S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J Immunol* 1990 Aug 1;145(3):940-4.
36. Saha B, Das G, Vohra H, Ganguly NK, Mishra GC. Macrophage-T cell interaction in experimental visceral leishmaniasis: failure to express costimulatory molecules on Leishmania-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immunity. *Eur J Immunol* 1995 Sep;25(9):2492-8.
37. Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 2001 Feb 1;166(3):1912-20.
38. Martins GA, Cardoso MA, Aliberti JC, Silva JS. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunol Lett* 1998 Sep;63(2):113-20.
39. Dasgupta S, Mookerjee A, Chowdhury SK, Ghose AC. Immunosuppression in hamsters with progressive visceral leishmaniasis: an evaluation of the role of nitric oxide toward impairment of the lymphoproliferative response. *Parasitol Res* 1999 Jul;85(7):594-6.
40. Locksley RM, Scott P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunol Today* 1991 Mar;12(3):A58-61.
41. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1994 Jun 15;152(12):5949-56.
42. Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacellar O, Carvalho EM, Kubin M, et al. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood

- mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *J Exp Med* 1995 Apr 1;181(4):1527-37.
43. Ghalib HW, Piuvezam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, et al. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *J Clin Invest* 1993 Jul;92(1):324-9.
 44. Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *J Clin Invest* 1993 Apr;91(4):1644-8.
 45. Carvalho EM, Badaro R, Reed SG, Jones TC, Johnson WD, Jr. Absence of gamma interferon and interleukin 2 production during active visceral leishmaniasis. *J Clin Invest* 1985 Dec;76(6):2066-9.
 46. Squires KE, Schreiber RD, McElrath MJ, Rubin BY, Anderson SL, Murray HW. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *J Immunol* 1989 Dec 15;143(12):4244-9.
 47. Murray HW, Miralles GD, Stoeckle MY, McDermott DF. Role and effect of IL-2 in experimental visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1993 Jul 15;151(2):929-38.
 48. Zwingenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Sandkamp B, Neifer S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Nov;57(2):242-9.
 49. Saha B, Basak SK, Roy S. Immunobiological studies on experimental visceral leishmaniasis. III. Cytokine-mediated regulation of parasite replication. *Scand J Immunol* 1993 Feb;37(2):155-8.
 50. Wilson ME, Young BM, Davidson BL, Mente KA, McGowan SE. The importance of TGF-beta in murine visceral leishmaniasis. *J Immunol* 1998 Dec 1;161(11):6148-55.
 51. Melby PC, Tryon VV, Chandrasekar B, Freeman GL. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun* 1998 May;66(5):2135-42.

52. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*2000 Feb;12(1):64-76.
53. Bogdan C, Rollinghoff M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*1998 Jan;28(1):121-34.
54. Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med*1999 Feb 15;189(4):741-6.
55. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem*1991 Apr 5;266(10):6259-63.
56. Cunha FQ, Moncada S, Liew FY. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*1992 Feb 14;182(3):1155-9.
57. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, McSorley SJ, Garside P, et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol*1994 Apr;24(4):980-4.
58. Dusse LMSA, Vieira LM, Carvalho MdG. Nitric Oxide Revision. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*2003;39(4):343-50.
59. Bohlke M. Malaria induced immunosuppression: is there a role to nitric oxide? *Rev bras alerg imunopatol*1999;22(6):173-8.
60. Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*1988 Nov 30;157(1):87-94.
61. Flora Filho R, Zilberstein B. [Nitric oxide: the simple messenger passing through complexity. Metabolism, synthesis and functions]. *Rev Assoc Med Bras*2000 Jul-Sep;46(3):265-71.
62. Romao PRT, Dias RdO, Cruz KK, Marques FCds, Monteiro MC. Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde - UNESC* 2007;3(1).

63. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RM, Moncada S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J Immunol* 1990 Jun 15;144(12):4794-7.
64. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995 Jun 1;375(6530):408-11.
65. Stenger S, Donhauser N, Thuring H, Rollinghoff M, Bogdan C. Reactivation of latent leishmaniasis by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1996 Apr 1;183(4):1501-14.
66. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992 Sep;6(12):3051-64.
67. Albina JE, Abate JA, Henry WL, Jr. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. Role of IFN-gamma in the induction of the nitric oxide-synthesizing pathway. *J Immunol* 1991 Jul 1;147(1):144-8.
68. Drapier JC, Hibbs JB, Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol* 1988 Apr 15;140(8):2829-38.
69. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 Apr 1;89(7):3030-4.
70. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994 Feb 4;263(5147):687-9.
71. Schwartz LM, Osborne BA. Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 1993 Dec;14(12):582-90.
72. Messmer UK, Ankarcrona M, Nicotera P, Brune B. p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett* 1994 Nov 21;355(1):23-6.
73. Ameisen JC, Groux H, Capron A. [Programmed death (apoptosis) of T CD4 lymphocytes and AIDS pathogenesis]. *C R Acad Sci III* 1992;314(9 Suppl):47-50.

74. Groux H, Torpier G, Monte D, Mouton Y, Capron A, Ameisen JC. Activation-induced death by apoptosis in CD4⁺ T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med* 1992 Feb 1;175(2):331-40.
75. Roger PM, Pradier C, Dellamonica P. [Mechanisms of lymphopenia in HIV infection]. *Presse Med* 1994 Jan 22;23(2):89-94.
76. Estaquier J, Marguerite M, Sahuc F, Bessis N, Auriault C, Ameisen JC. Interleukin-10-mediated T cell apoptosis during the T helper type 2 cytokine response in murine *Schistosoma mansoni* parasite infection. *Eur Cytokine Netw* 1997 Jun;8(2):153-60.
77. Toure-Balde A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, et al. *Plasmodium falciparum* induces apoptosis in human mononuclear cells. *Infect Immun* 1996 Mar;64(3):744-50.
78. Balde AT, Aribot G, Tall A, Spiegel A, Roussilhon C. Apoptosis modulation in mononuclear cells recovered from individuals exposed to *Plasmodium falciparum* infection. *Parasite Immunol* 2000 Jun;22(6):307-18.
79. Hu MS, Schwartzman JD, Yeaman GR, Collins J, Seguin R, Khan IA, et al. Fas-FasL interaction involved in pathogenesis of ocular toxoplasmosis in mice. *Infect Immun* 1999 Feb;67(2):928-35.
80. Khan IA, Matsuura T, Kasper LH. Activation-mediated CD4⁺ T cell unresponsiveness during acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. *Int Immunol* 1996 Jun;8(6):887-96.
81. Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca ME, DosReis GA. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol* 1995 Jan 15;154(2):744-52.
82. Conceicao-Silva F, Hahne M, Schroter M, Louis J, Tschopp J. The resolution of lesions induced by *Leishmania major* in mice requires a functional Fas (APO-1, CD95) pathway of cytotoxicity. *Eur J Immunol* 1998 Jan;28(1):237-45.
83. Huang FP, Xu D, Esfandiari EO, Sands W, Wei XQ, Liew FY. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J Immunol* 1998 May 1;160(9):4143-7.

84. Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2000 Mar;33(3):317-25.
85. Das G, Vohra H, Rao K, Saha B, Mishra GC. Leishmania donovani infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. *Scand J Immunol* 1999 Mar;49(3):307-10.
86. Dwyer DM. Antibody-induced modulation of Leishmania donovani surface membrane antigens. *J Immunol* 1976 Dec;117(6):2081-91.
87. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Dec;78(12):7764-8.
88. Frenkel JK, Caldwell SA. Specific immunity and nonspecific resistance to infection: listeria, protozoa, and viruses in mice and hamsters. *J Infect Dis* 1975 Mar;131(3):201-9.
89. Bilate AM, Salemi VM, Ramires FJ, de Brito T, Silva AM, Umezawa ES, et al. The Syrian hamster as a model for the dilated cardiomyopathy of Chagas' disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis. *Microbes Infect* 2003 Oct;5(12):1116-24.
90. Campos-Neto A, Bunn-Moreno MM. Polyclonal B cell activation in hamsters infected with parasites of the genus Leishmania. *Infect Immun* 1982 Dec;38(3):871-6.
91. Espitia CM, Zhao W, Saldarriaga O, Osorio Y, Harrison LM, Cappello M, et al. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. *BMC Immunol* 2010;11:31.
92. Travi BL, Osorio Y, Melby PC, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with Leishmania spp. *Infect Immun* 2002 May;70(5):2288-96.
93. Rama Iniguez S, Dea-Ayuela MA, Sanchez-Brunete JA, Torrado JJ, Alunda JM, Bolas-Fernandez F. Real-time reverse transcription-PCR quantification of

- cytokine mRNA expression in golden Syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin B formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 Apr;50(4):1195-201.
94. Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD, Jr. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest* 1989 Mar;83(3):860-4.
 95. Goto H, Prianti MG. Immunoactivation and immunopathogeny during active visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009 Sep-Oct;51(5):241-6.
 96. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol* 2002 Nov;2(11):845-58.
 97. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, et al. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 1992 Jul 24;257(5069):545-8.
 98. Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun* 1995 Dec;63(12):4862-7.
 99. Dusting GJ, Macdonald PS. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann Med* 1995 Jun;27(3):395-406.
 100. Ahvazi BC, Jacobs P, Stevenson MM. Role of macrophage-derived nitric oxide in suppression of lymphocyte proliferation during blood-stage malaria. *J Leukoc Biol* 1995 Jul;58(1):23-31.
 101. Schleifer KW, Mansfield JM. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *J Immunol* 1993 Nov 15;151(10):5492-503.
 102. Abrahamsohn IA, Coffman RL. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 1995 Oct 15;155(8):3955-63.
 103. Alexander CE, Kaye PM, Engwerda CR. CD95 is required for the early control of parasite burden in the liver of *Leishmania donovani*-infected mice. *Eur J Immunol* 2001 Apr;31(4):1199-210.

Apêndice

Aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP – CAPPesq

 Recebido
 20/6/12

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
 DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
 RUA ODESSA, 180 - JARDIM PAULISTA - 05508-900

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 04/06/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 0282/08, Intitulado: **"APOPTOSE DE LINFÓCITOS NA IMUNOSSUPRESSÃO DA LEISHMANIOSE VISCERAL EM HAMSTERES INFECTADOS COM LEISHMANIA (LEISHMANIA) CHAGASI"** apresentado pelo área de **PSIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL** de 2007, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme parecer anexo.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional da Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX,2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Dr. José Angelo Lavietta Lindoso**
 Pesquisador (a) Executante: **Camilla Fazzoni**

CAPPesq, 06 de Junho de 2008

Encaminhe-se à CAPG-FMUSP
para as devidas providências.
SP, 06.06.08

 Prof. Dra. Rita Garcia Caldini
 Programa Fisiopatologia Experimental
 Pós-Graduação em Ciências
 Suplente de Coordenador

 Prof. Dr. Eduardo Massad
 Presidente da Comissão de
 Ética para Análise de Projetos
 de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Odeia Faria da Campos, 253, 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6102 e-mail: cappel@hcfmusp.br / secretaria.cappel@hcfmusp.br